



Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

**Determinação e utilização do perfil em ácidos gordos dos lípidos totais do músculo cardíaco para caracterização de populações de *Petromyzon marinus*, L. nas várias bacias hidrográficas portuguesas**

– Tese de mestrado –

Realizado por:

**Maria Ana Potes Amaral Machado**

Orientador:

Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria João Lança

(Departamento de Zootecnia/Universidade de Évora)

Prof. Doutor Rui Ferreira

(Departamento de Química/Universidade de Évora)

Évora

**2010**



***Para o João***



## **Agradecimentos**

Embora uma dissertação seja, pela sua finalidade académica, um trabalho individual, há contributos de natureza diversa que não podem nem devem deixar de ser realçados. Por essa razão, expressar os meus sinceros agradecimentos é somente uma das formas de demonstrar-lhes a minha gratidão.

Agradeço ao Professor Doutor Pedro Raposo de Almeida do Departamento de Biologia da Universidade de Évora por me ter incluído na sua equipa de investigação no âmbito do Projecto científico Estrutura genética e filogeográfica das lampreias (Petromyzontidae) – definição de unidades de conservação e gestão, no qual este trabalho se inseriu.

Agradeço à Professora Doutora Maria João Lança, do Departamento de Zootecnia da Universidade de Évora, o ter aceite ser minha orientadora, a sua preciosa disponibilidade e afeição sem a qual este trabalho não poderia ter sido realizado.

Agradeço igualmente ao Professor Doutor Rui Ferreira, do Departamento de Química da Universidade de Évora por ter aceite ser novamente meu co-orientador e me acompanhar sempre nestas jornadas científicas.

Este trabalho não teria sido possível sem a assistência dedicada e sempre atenciosa da Professora Doutora Isabel Ferreira do Departamento de Química da Universidade de Évora.

Agradeço, em especial, à Professora Doutora Maria João Cabrita e à Engenheira Antónia Oliveira, do Departamento de Fitotecnia, não somente por terem tido um papel de orientação nalgumas práticas laboratoriais, mas também pela sua amizade e auxílio na concretização deste trabalho.

Uma palavra de gratidão ao Professor Doutor Alfredo Pereira, do Departamento de Zootecnia da Universidade de Évora, pelo grande auxílio nas questões estatísticas.

O meu agradecimento ao Doutor Bernardo Quintella, do Centro de Oceanografia da Universidade de Lisboa, que através dos seus trabalhos me guiou na execução desta dissertação.

Agradeço à Catarina Mateus, que me inseriu na equipa do Centro Oceanográfico e com a qual trabalhei noites a fio durante dois intensos meses para adquirir as lampreias das diferentes bacias hidrográficas e preparação de materiais para posterior tratamento laboratorial. Agradeço igualmente o precioso auxílio na preparação do material, desde a eutanásia das lampreias, dissecação

dos órgãos e tecidos até seu armazenamento, ao Bernardo Quintella, Felipe Neves, Vera Veloso, Carlos Alexandre, Sílvia Pedro entre outros que por ali passaram para dar uma mãozinha.

Os meus agradecimentos também ao imprescindível suporte técnico e à generosidade da Engenheira Graça Machado e Vera Palma que disponibilizaram sempre os seus préstimos e carinhosamente me apoiaram na execução do trabalho laboratorial.

Agradeço o apoio, companheirismo e amizade de todos os funcionários e colegas do Laboratório de Enologia da Universidade do Évora durante a minha estadia, desde o Rui Bicho, à Rita Ramalhinho. Não posso esquecer de agradecer à Dona Balbina Mendes e à Dona Margarida Romão que sempre me complementaram na logística do trabalho laboratorial e me fizeram rir nos momentos de desânimo.

Um agradecimento especial ao meu primo José Maria e à minha irmã Brígida Machado que tiveram a gentileza de me auxiliar, respectivamente, na formatação e na ilustração científica desta monografia.

Não podia deixar de agradecer às pessoas mais importantes da minha vida. À minha família, pais, irmãos, pelo apoio incondicional que sempre me deram. Sei que estão orgulhosos de mim por ter concluído mais esta fase, e este trabalho é em parte para vós. Especialmente quero agradecer aos meus pais por terem suportado os encargos dos meus estudos e, pela confiança que me incutiram ao longo dos meus anos de vida, sei que é a vós que devo o facto de ser aquilo que sou hoje.

Gostaria de estender os meus agradecimentos a todos aqueles de uma forma ou de outra (fornecendo ideias e/ou criticando), foram ajudando anonimamente nas inúmeras discussões ao longo deste ano.

Por último, queria agraciar o João, que através do seu incansável carácter e camaradagem, me ter motivado durante concretização desta tese e, simplesmente, por me fazer feliz.

## Prefácio

O presente trabalho intitula-se: “Determinação e utilização do perfil em ácidos gordos dos lípidos totais do músculo cardíaco para caracterização de populações de *Petromyzon marinus*, L. nas várias bacias hidrográficas portuguesas”, inserido no projecto “Estrutura Genética e Filogenética das Lampreias (Petromyzontidae): Definição de unidades de conservação e gestão” financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (PTDC/BIA-BDE/71826/2006). Este projecto resultou da parceria entre a Universidade de Évora (instituição proponente), o Centro de Oceanografia e o Centro de Biologia Ambiental/Museu Nacional de História Natural (ambas as instituições representadas legalmente pela Fundação da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa).

No presente estudo pretende-se averiguar se o perfil em ácidos gordos do tecido cardíaco poderá ser considerado um marcador de discriminação para as populações de lampreia-marinha (*Petromyzon marinus*, L.) das várias bacias hidrográficas portuguesas. Como tal, este trabalho é composto por uma componente teórica que engloba o primeiro, segundo e terceiro capítulos, uma parte prática constituída pelo quarto, quinto e sexto capítulos e uma listagem de todas as referências bibliográficas utilizadas na realização deste estudo.

O primeiro capítulo expõe as motivações e objectivos definidos para o trabalho. O segundo capítulo, é formado por uma fundamentação teórica que descreve o objecto de estudo, a lampreia-marinha, assim como as principais bacias hidrográficas portuguesas onde ela se encontra e a legislação internacional e nacional. Neste capítulo é ainda feita uma revisão sobre o metabolismo lipídico, com especial destaque para os peixes e composição dos ácidos gordos no tecido cardíaco.

O terceiro capítulo, referente ao trabalho de campo e laboratorial, descreve a metodologia utilizada para concretizar os objectivos propostos. A primeira parte corresponde à captura, amostragem e preservação das amostras de tecido cardíaco. A segunda parte descreve o trabalho laboratorial. O quarto capítulo desta dissertação inclui a apresentação dos resultados obtidos e o respectivo tratamento estatístico.

O quinto capítulo inclui a discussão dos resultados obtidos e enuncia as principais conclusões deste trabalho.

No último capítulo é apresentada a lista de referências bibliográficas que suportou a concretização deste trabalho.

## Resumo

Maria Ana Potes Amaral Machado (2010). **Determinação e utilização do perfil em ácidos gordos dos lípidos totais do músculo cardíaco para caracterização de populações de *Petromyzon marinus*, L. nas várias bacias hidrográficas portuguesas.** Tese de mestrado (M. João Lança e R. Ferreira, orientadores) Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Évora, Portugal.

O objectivo principal deste estudo foi a discriminação de populações de lampreia-marinha (*Petromyzon marinus*, L.) em início da época de migração reprodutora nas bacias hidrográficas portuguesas – Minho, Lima, Cávado, Douro, Vouga, Mondego, Tejo e Guadiana – utilizando o perfil em ácidos gordos do músculo cardíaco. Os ésteres metílicos dos ácidos gordos, obtidos por esterificação dos lípidos totais extraídos, foram identificados e quantificados por cromatografia gasosa, sendo comparados com os tempos de retenção do padrão externo na presença do padrão interno éster metílico C19:0.

Os ácidos gordos predominantes foram os saturados, seguidos pelos monoinsaturados e poliinsaturados, apresentando maior poder discriminante os ácidos gordos C17:0, o C20:1 $\omega$ 9, o C16:0, o C20:4 $\omega$ 6, o C18:  $\omega$ 9 e o C14:0.

Apesar da significativa segregação entre as amostras provenientes das oito bacias hidrográficas estudadas não é seguro concluir pelo isolamento de cada uma delas. A análise destes resultados deverá ser complementada por estudos genéticos.



## Abstract

Maria Ana Potes Amaral Machado (2010). **Determination and use fatty acid profile of total lipids of heart muscle to characterize populations of *Petromyzon marinus*, L. in several Portuguese river basins.** Master's thesis (M. João Lança e R. Ferreira, orientadores, advisers), Sciences and Technology School, University of Évora, Évora, Portugal.

The main objective of this study was differentiate sea lamprey (*Petromyzon marinus*, L.) populations at the beginning of the reproductive upstream migration, from several Portuguese river basins – Minho, Lima, Cávado, Douro, Vouga, Mondego, Tagus and Guadiana – using fatty acid profile of heart tissue. Fatty methyl esters (FAME), obtained by esterification of total lipids extracted, were identified and quantified through gas chromatography, being compared with external standard retention times, in presence of internal standards C19:0 methyl ester.

The most representative were saturated fatty acids, followed by monounsaturated and polyunsaturated fatty acids, and those who presented more discriminating ability were C17:0, C20:1 $\omega$ 9, C16:0, C20:4 $\omega$ 6, C18: $\omega$ 9 and C14:0.

Despite the significant segregation between samples from the eight river basins, it's not safe to conclude by total isolation of which one of them. Analysis of these results should be complemented by genetic studies.

# Índice

Agradecimentos .....	v
Prefácio .....	vii
Resumo .....	viii
Abstract.....	ix
Índice de figuras .....	xii
Índice de quadros .....	xiii
Abreviaturas.....	xv
Nomenclatura de enzimas .....	xvi
1. Motivação e objectivos.....	1
1.1. Objectivo geral.....	2
1.2. Objectivos específicos .....	2
2. Fundamento teórico .....	5
2.1. Filogenia e taxonomia da lampreia-marinha.....	5
2.2. Distribuição geográfica da lampreia-marinha .....	6
2.2.1. Caracterização das principais bacias hidrográficas de Portugal .....	7
2.3. Ciclo de vida da lampreia-marinha .....	11
2.4. Morfologia da lampreia-marinha.....	15
2.4.1. Sistema cardiovascular da lampreia-marinha.....	16
2.5. A importância dos ácidos gordos na lampreia-marinha .....	17
2.5.1. Caracterização físico-química e nomenclatura dos ácidos gordos .....	17
2.5.2. Metabolismo dos ácidos gordos .....	21
2.6. Causas do desaparecimento da lampreia-marinha .....	34
2.6.1. Legislação nacional e internacional de Protecção da Lampreia-marinha .....	38
3. Metodologia .....	42
3.1. Estratégia.....	42

3.2. Organigrama .....	43
3.3. Material e métodos .....	44
3.3.1. Reagentes e equipamento.....	44
3.4. Procedimento experimental.....	44
3.4.1. Captura e eutanásia .....	45
3.4.2. Caracterização biométrica e recolha do tecido cardíaco .....	45
3.4.3. Análise da composição em ácidos gordos do tecido cardíaco.....	46
3.4.3.4. Análise estatística de dados .....	49
4. Resultados e Discussão .....	51
4.1. Parâmetros biométricos.....	51
4.2. Perfil dos ácidos gordos do músculo cardíaco.....	59
5. Conclusão .....	74
6. Referências.....	76
Anexos .....	86

## Índice de figuras

Fig. 1– Ilustração da lampreia-marinha. ....	5
Fig. 2 – Distribuição geográfica mundial da lampreia-marinha .....	6
Fig. 3 – Ilustração das bacias hidrográficas Portuguesas Minho, Lima, Cávado, Douro, Vouga, Mondego, Tejo e Guadiana e respectivos afluentes .....	10
Fig. 4 – Localização dos afluentes das oito bacias hidrográficas e respectivas barragens .....	35
Fig. 5– Ilustração da cavidade bucal da lampreia-marinha.....	15
Fig. 6 – Esquema anatómico da lampreia-marinha .....	16
Fig. 7 – Esquema anatómico ampliado da extremidade frontal da lampreia-marinha .....	16
Fig. 8 – $\beta$ -oxidação de ácidos gordos mitocondrial .....	24
Fig. 9 – $\beta$ -oxidação completa do ácido palmítico .....	25
Fig. 10 – Reacções de transformação do acetoacetil-ACP em butirilo-ACP, no citoplasma. ....	28
Fig. 11 – Mecanismo de síntese de ácidos gordos enfatizando a transferência de acetil-CoA das mitocôndrias para o citoplasma, com produção de NADPH. ....	29
Fig. 12 – Representação da maioria das Vias de síntese de ácidos gordos poliinsaturados nos animais. Na vertical estão representadas as insaturações e na horizontal os alongamentos da cadeia. O tamanho das letras representa, na maioria dos casos, a acumulação nos tecidos .....	30
Fig. 13 – Cromatograma dos ácidos gordos do padrão FAME MIX 37 e ao padrão interno C19:0. ....	48
Fig. 14 – Relação entre peso corporal eviscerado (Twe, g) e o comprimento (TL, cm) das lampreias marinhas da bacia do Lima.....	59
Fig. 15 – Cromatograma dos ésteres metílicos dos ácidos gordos dos lípidos totais do músculo cardíaco de uma lampreia-marinha da bacia do Tejo. O padrão interno usado foi o éster metílico C19:0. ....	60
Fig. 16 – Análise da função discriminante canónica das lampreias marinhas das oito bacias hidrográficas, representada por 152 indivíduos e usando 30 ácidos gordos, cuja média apresentava maior variância. ....	68

## Índice de quadros

Quadro 1 – Designação química (A), comum (B) e sistemática (C) de alguns ácidos gordos saturados e respectiva fórmula molecular (D). .....	20
Quadro 2 – Designação química (A), comum (B) e sistemática (C) de alguns ácidos gordos monoinsaturados.....	20
Quadro 3 – Designação química (A), comum (B) e sistemática (C) de alguns ácidos gordos poliinsaturados. ....	20
Quadro 4 – Balanço energético de um ciclo de $\beta$ -oxidação.....	25
Quadro 4 - Lista de reagentes com respectivo grau de pureza e fornecedor.....	44
Quadro 5 - Lista de equipamento e respectiva marca.....	44
Quadro 6 - Coordenadas dos locais de capturas das lampreias marinhas. ....	45
Quadro 7 – Parâmetros programados no ASE para extracção de lípidos.....	47
Quadro 8 - Condições experimentais utilizadas na análise cromatográfica. ....	48
Quadro 9 – Parâmetros biométricos de 19 indivíduos das bacias hidrográficas Minho, Lima, Cávado e Douro: o peso total (Pt, g), o comprimento total (Ct, cm), o peso do coração (Pt, g), índice entre o peso do coração e o peso corporal eviscerado (Pc/Pte, %) e o respectivo género.....	55
Quadro 10 – Parâmetros biométricos de 19 indivíduos das bacias hidrográficas Vouga, Mondego, Tejo e Guadiana: o peso total (Pt, g), o comprimento total (Ct, cm), o peso do coração (Wo, g), índice entre o peso do coração e o peso corporal eviscerado (Pc/Pte, %) e o respectivo género.....	56
Quadro 11 – Coeficientes isométrico (Ki) e alométrico (Ka).....	57
Quadro 12 – Percentagem de água perdida durante o processo de liofilização (%H <sub>2</sub> O), rendimento da extracção dos lípidos totais ( $\mu$ ) e lípidos totais, em g, por g de músculo cardíaco (LT/Pc). ....	58
Quadro 14 – Composição dos ácidos gordos do músculo cardíaco de lampreia-marinha de oito bacias hidrográficas Portuguesas. SFA – Ácidos gordos saturados; MUPA – Ácidos gordos monoinsaturados; PUFA - Ácidos gordos poliinsaturados e ND – Não detectável.....	62
Quadro 15 – Valor de Eigen e correlação canónica discriminante obtida nas oito bacias hidrográficas.....	67

Quadro 16 – Resultados do teste Wilks'Lambda ( $\Lambda$ ) e Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para verificar a hipótese de que as médias dos centróides das funções são iguais nos oito grupos quando os ácidos gordos dos lipídios totais do tecido cardíaco são separados pela análise discriminante.....	67
Quadro 17 – Resultados do teste Q de Press. N – Total da amostra; n – Total de indivíduos correctamente classificados; k – Número de grupos.....	67
Quadro 18 – Resultados do Pairwise group comparison (poder descriminate do teste Q Press).....	68
Quadro 19 – Resultados da classificação da análise discriminante das oito bacias hidrográficas.....	68
Quadro 20 – Resultados do índice de potência. ....	69

## Abreviaturas

AA	Ácido araquidónico
ALA	Ácido $\omega$ -linolénico
ASE	<i>Accelerated Solvent Extraction</i> – Sistema de extracção com solvente de alta pressão
ATP	Adenosina trifosfato
BHT	Di-ter-butil metil fenol
BF <sub>3</sub>	Triflureto de boro
DHA	Ácido docosahexaenoico
DP	Desvio padrão
EPA	Ácido Eicosapentaenóico
FAMEs	<i>Fatty acid methyl esters</i> – Esteres metílicos de ácidos gordos
FAD	Dinucleótido de flavina e adenina
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> - Detector de ionização por chama
Fig	Figura
GC	<i>Gas- chromatography</i> – Cromatografia gasosa
Ki	Factor de condição de Fulton
Ka	Factor de condição alométrico
LA	Ácido linoléico
LT	Lípidos totais
MANOVA	<i>Multivariate analysis of variance</i> – Análise de variância multivariada
MDA	<i>Multiple discriminant analysis</i> – Análise múltipla discriminante
MUFA	<i>Monounsaturated fatty acid</i> – Ácidos gordos monoinsaturados
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
PUFA	<i>Poliunsaturated fatty acid</i> – Ácidos gordos poliinsaturados
SFA	<i>Saturated fatty acid</i> – Ácidos gordos saturados
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i> – Sistema estatístico para Ciências Sociais
TI	Comprimento
Tw	Peso corporal eviscerado
Twe	Peso corporal total
Wo	Peso do coração

## **Nomenclatura de enzimas**

Acetyl-CoA carboxylase (EC 6.4.1.2)

Ácido gordo sintetase (FAS) (EC 2.3.1.85)

Acil-CoA sintetase ou tiocinase (EC 6.2.1.3)

Acil carnitina transferase I (EC.2.3.1.21)

Acil carnitina transferase II (E 2.3.1.21)

Acil- CoA desidrogenase (EC 1.3.99.3)

Acil-CoA dessaturases (EC 1.3.99)

Carnitina acetil-CoA (EC 2.3.1.7)

Ceto-acil tiolase (EC:2.3.1.16)

Citocromo c oxidase (EC 1.9.3.1)

Colesterol esterase (EC 3.1.1.13)

Enoil-CoA hidratase ou  $\beta$ -hidroxiacil-CoA hidratase (EC 4.2.1.17)

Fosfolipase A<sub>2</sub> (EC 3.1.1.4)

Insaturase  $\Delta 5$  (EC 1.14.19)

Insaturase  $\Delta 6$  (EC 1.14.19)

Insaturase  $\Delta 9$  (EC 1.14.19)

Lipase pancreática de triacilgliceróis (EC 3.1.1.3)

Lipase lipoproteíca (EC.3.1.1.34)

Lipoxigenase (EC.1.13.11.34)

Prostaglandina endoperóxido sintetase (EC.1.14.99.1)



## 1. Motivação e objectivos

As lampreias, juntamente com as mixinas, são de grande interesse biológico na medida em que representam o grupo mais antigo de vertebrados, os Agnatha (Le Blanc *et al.*, 1995).

A lampreia-marinha (*Petromyzon marinus*, L.) é uma espécie ameaçada em Portugal. O declínio da população de lampreia-marinha em território nacional deve-se fundamentalmente à sobrepesca e aos obstáculos construídos ao longo dos rios, tal como os açudes e barragens, causando interrupção no percurso de migração e consequente desova e reprodução (Almeida *et al.*, 2000; Quintella *et al.*, 2003; ICN, 2006). Estas e outras causas levaram à necessidade de estudar a biologia e ecologia da lampreia-marinha para posterior conservação em território nacional

A necessidade de identificar e diferenciar espécies e/ou populações de peixes permitiu desenvolver diferentes metodologias científicas com base em estudos morfológicos, análise de otólitos, análises genómicas, técnicas de electroforese e electrofocalização de enzimas (Rehbein, 1990; Sundt *et al.*, 1998; Saborido-Rey *et al.*, 2000; Joensen *et al.*, 2000b). Alguns destes métodos, são por vezes questionáveis ou ineficientes na discriminação de determinadas populações (Grant, 1987; Rehbein, 1990; Sundt *et al.*, 1998; Joensen *et al.*, 2000a). Como tal, o estudo de biomarcadores bioquímicos, como a caracterização de perfis lipídicos de um tecido e/ou órgão, tem vindo a ser proposto como uma possível ferramenta eficaz na discriminação de populações (Joensen, Steingrund *et al.*, 2000; Hóraldur *et al.*, 2004).

Os lípidos são moléculas orgânicas que não se encontram sob a forma livre nos tecidos dos animais. Estes são constituídos por diferentes combinações de ácidos gordos com outros compostos formando misturas moleculares complexas. A cromatografia gasosa de fase estacionária tornou-se uma técnica frequentemente utilizada na área da lipidómica que permite identificar um amplo conjunto de ácidos gordos nestas misturas complexas e ainda em vários tecidos (Grahl-Nielsen, 1999; Hasselbaink *et al.*, 2002; Hóraldur *et al.*, 2004).

Num estudo prévio, foi possível detectar que o músculo das lampreias marinhas presentes na bacia hidrográfica do Tejo apresentava um perfil lipídico diferente em ácidos gordos comparativamente ao músculo das lampreias das bacias hidrográficas do Minho e Vouga (Pinela *et al.*, 2009).

A composição lipídica do músculo comparativamente com o músculo cardíaco é altamente influenciada pela dieta e por factores inerentes ao próprio ciclo de vida do animal (Van der Vusse *et al.*, 1992; Van Bilsen *et al.*, 1998). Neste trabalho procedeu-se à análise da composição relativa em

ácidos gordos no músculo cardíaco que apesar de ser caracterizado por uma elevado *turnover* ao nível do metabolismo lipídico exibe um perfil considerado estável pois conserva a mesma composição em ácidos gordos (Joensen and Grahl-Nielsen, 2000; Joensen, Steingrund *et al.*, 2000; De Windt *et al.*, 2001; Hasselbaink *et al.*, 2002; Otis *et al.*, 2003; Joensen *et al.*, 2004). Assim sendo e, porque a origem e o destino metabólico dos ácidos gordos no músculo cardíaco dependem do comprimento da cadeia e do grau de insaturação que os caracteriza (Hasselbaink *et al.*, 2002), a caracterização do perfil em ácidos gordos no músculo cardíaco de lampreia-marinha foi realizada nas principais bacias hidrográficas Portuguesas (Minho, Lima, Cávado, Douro, Vouga, Mondego, Tejo e Guadiana) com o intuito de averiguar se o perfil em ácidos gordos pode ser uma ferramenta na discriminação de populações. Neste estudo, tal como no estudo de Otis e Heintz (2003), assume-se que a variação da composição em ácidos gordos dentro de uma população reprodutora é igual à variação observada entre essa população e outras populações em desova, sem controlo por idade, sexo e maturidade das gónadas (Otis *et al.*, 2003).

Neste trabalho propõe-se apresentar a base teórica essencial à compreensão do ciclo de vida da lampreia-marinha e seu metabolismo lipídico bem como, a metodologia que permite a identificação e quantificação de ácidos gordos dos lípidos totais do músculo cardíaco para posterior discriminação inter-populacional nas bacias hidrográficas portuguesas.

### **1.1. Objectivo geral**

Caracterização do perfil em ácidos gordos dos lípidos totais do músculo cardíaco de lampreia-marinha para discriminação de populações nas principais bacias hidrográficas portuguesas.

### **1.2. Objectivos específicos**

#### **I. Conhecer**

O processo de captura da lampreia-marinha.

O procedimento de dissecção da lampreia-marinha.

O conteúdo em lípidos totais do músculo cardíaco da lampreia-marinha.

A composição em ácidos gordos dos lípidos totais no músculo cardíaco da lampreia-marinha.

#### **II. Compreender**

A influência do ciclo de vida, género e localização geográfica na composição em ácidos gordos do tecido cardíaco da lampreia-marinha.

A metodologia para determinação do perfil em ácidos gordos do músculo cardíaco da lampreia-marinha.

### **III. Valorizar**

O perfil em ácidos gordos dos lípidos totais do tecido muscular cardíaco da lampreia-marinha como possível marcador natural e ferramenta para a caracterização e discriminação inter-populacional de lampreia-marinha nas principais bacias hidrográficas portuguesas.

### **IV. Aplicar**

Metodologia de identificação e quantificação de ácidos gordos em tecido cardíaco de lampreia-marinha em várias bacias hidrográficas portuguesas:

- a) Processamento das amostras biológicas recolhidas em oito bacias hidrográficas nacionais (Minho, Lima, Cavado, Douro, Vouga, Mondego, Tejo e Guadiana);
- b) Extracção de lípidos totais do músculo, saponificação e metilação;
- c) Análise cromatográfica dos ácidos gordos dos lípidos totais do músculo cardíaco para a identificação e quantificação dos ácidos gordos dos animais de cada bacia.



## 2. Fundamento teórico

### 2.1. Filogenia e taxonomia da lampreia-marinha

As lampreias são vertebrados aquáticos que, juntamente com as Mixinas, pertencem ao grupo dos ciclóstomos (*cyklos*, circular, e *stoma*, boca) e são representantes da divisão Agnata (*gnathos*, mandíbula), por apresentarem o aparelho bucal com formato circular e desprovido de mandíbula (Hardisty, 1986b).

Em Portugal, existem três espécies de lampreia: a lampreia-marinha (*Petromyzon marinus*, Linnaeus, 1758), a lampreia de rio (*Lampetra fluviatilis* Linnaeus, 1758) e a lampreia de riacho (*Lampetra planeri* Bloch, 1784) (Baldaque da Silva, 1891; Nobre, 1932; Almaça *et al.*, 1988; Almaça *et al.*, 1991; Almaça, 1995). As primeiras duas espécies são parasitas e anádromas e a última é holobiótica e não parasita, habitando estritamente em ambiente de água doce (Hardisty, 1986b).



Fig. 1– Ilustração da lampreia-marinha (autoria de Brígida Machado).

A lampreia *Petromyzon marinus* L. é classificada segundo a seguinte posição filogenética descrita por Nelson (2006):

**Filo** Chordata

**Subfilo** Craniata

**Superclasse** Petromyzontomorphi

**Classe** Petromyzontida

**Ordem** Petromyzontiformes

**Família** Petromyzontidae

**Subfamília** Petromyzontinae

**Género** *Petromyzon*

**Espécie** *Petromyzon marinus*

As lampreias distinguem-se dos restantes peixes, pelo facto de não possuírem verdadeiras maxilas ou apêndices pares, razão pela qual são colocadas na super-classe Petromyzontomorphi (Nelson, 2006). O género *Petromyzon* compreende apenas a espécie

anádroma e parasita *P. marinus* (Quintella, 2006). Considera-se como espécie anádroma aquela em que parte do seu ciclo de vida é passado em ambiente marinho e a outra parte em água doce, na qual sobe os rios para acasalar e desovar (Hardisty *et al.*, 1971a).

## 2.2. Distribuição geográfica da lampreia-marinha

A lampreia-marinha distribui-se em ambas as costas do Oceano Atlântico. Na América do Norte, são encontradas lampreias marinhas desde Labrador até Florida, e uma forma holobiótica (não migradora) nos Grandes Lagos da América do Norte (Applegate, 1950; Smith, 1971; Pearce *et al.*, 1980; Smith *et al.*, 1980).

Na Europa, a lampreia-marinha distribui-se desde o mar Barents até ao mar Mediterrâneo. No Norte da Europa, nas zonas costeiras da Noruega e Suécia e, até mesmo, em algumas zonas no mar Báltico são encontradas esporadicamente lampreias marinhas, no entanto, são raras na costa da Finlândia e na desembocadura de alguns nos rios da Polónia (Penczak, 1964; Hubbs *et al.*, 1971; Witkowski, 1992; Saat *et al.*, 2002). Nos rios da Europa central a sua existência reduz-se a um menor número de indivíduos ou mesmo à sua completa extinção (Freyhof, 2002; Lusk *et al.*, 2002). Nas ilhas britânicas as populações mais significativas são as do sudoeste da Inglaterra, dos rios que drenam para o canal da Bristol e ao sul do País de Gales. Nos rios da Europa Ocidental que drenam para o Atlântico as lampreias marinhas encontram-se em abundância. É comum nos rios na Península Ibérica embora tenha vindo a ficar restrita às desembocaduras dos rios (Hardisty, 1986b). No Mar Mediterrâneo existem relatos da presença de lampreias marinhas até à costa da Albânia no mar Adriático e à volta da Malta, Córsega e Sicília assim como à costa noroeste africana (Economidis *et al.*, 1999; Doadrio, 2001; Povz, 2002; Holčík *et al.*, 2004).

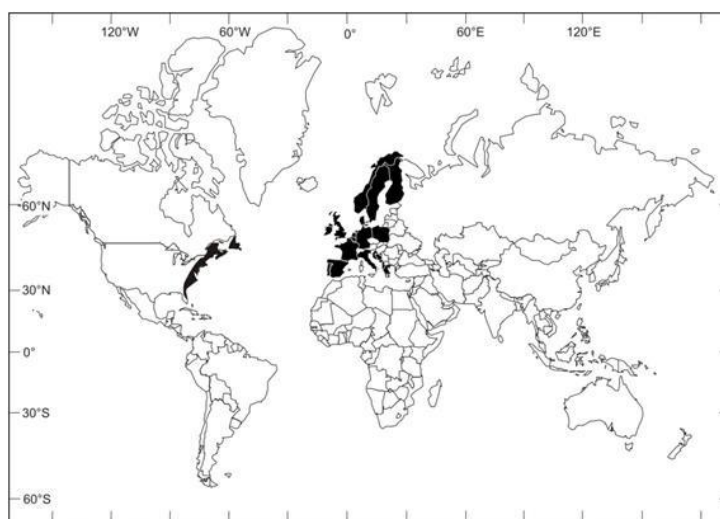


Fig. 2 – Distribuição geográfica mundial da lampreia-marinha (mapa desenhado de acordo com a informação fornecida por (Beamish, 1980; Maitland, 1980; Hardisty, 1986b; Halliday, 1991; Dempson *et al.*, 1993; Economidis *et al.*, 1999; Holčík *et al.*, 2004).

Em Portugal, a lampreia-marinha é encontrada em todas as principais bacias hidrográficas, sendo mais abundante nas regiões do norte e centro do país. A lampreia marinha é muito abundante no rio Minho, Mondego e Tejo, e comum nos rios Lima, Neiva, Cávado, Ave, Douro, Vouga e Guadiana (Figura 1). De acordo com estudos recentes, as populações dos rios Neiva e Ave extinguiram-se ao longo do século passado (Almeida, Quintella, Dias *et al.*, 2002; Almeida, Silva *et al.*, 2002; Quintella *et al.*, 2003; Rogado *et al.*, 2005). No rio Minho, o limite superior na migração da lampreia-marinha é a barragem de Frieria, em território espanhol. Os tributários Mouro, Gadanha e Coura são comumente utilizados por adultos para desovar e como locais de crescimento das larvas. No rio Lima, a lampreia-marinha é comum até ao primeiro obstáculo intransponível, a barragem de Touvedo. Os tributários Estorãos e Vez são também usados como habitats de desova e crescimento de larvas (dados não publicados). No rio Cávado, a lampreia-marinha encontra-se presente em número reduzido abaixo da barragem de Peniche. O rio Douro é bloqueado pela barragem de Crestuma-Lever, no entanto, todos os anos a lampreia-marinha é capturada abaixo e acima deste obstáculo (dados não publicados). No rio Vouga, e depois de passar a lagoa salobra “Ria de Aveiro, a lampreia-marinha é detida pela barragem de Grela que é um obstáculo incontornável. No entanto, estão presentes nos tributários Caima e Águeda. No rio Mondego, desde a construção da barragem Açude-Ponte, a lampreia-marinha é forçada a completar o seu ciclo de vida até à extensão de 35 km da foz do rio (Quintella *et al.*, 2003). Em anos de sobre-nutrição, é possível encontrar lampreia em alguns tributários, denominados rio Ceira e Alva (Almeida, Quintella, Dias *et al.*, 2002). No rio Tejo, as lampreias podem ser encontradas abaixo da barragem de Belver, no tributário rio Zêzere até à barragem de Castelo de Bode. No rio Guadiana, esta espécie migra até à falha “Pulo do Lobo” (dados não publicados).

### **2.2.1. Caracterização das principais bacias hidrográficas de Portugal**

Como o presente estudo pretende identificar e quantificar ácidos gordos que fazem parte da constituição do conteúdo lipídico do músculo cardíaco de lampreias marinhas foi essencial conhecer e caracterizar as bacias hidrográficas portuguesas das quais se extraíram os indivíduos utilizados neste estudo.

O rio Minho é um rio internacional partilhado por Portugal e Espanha. Este nasce em Espanha, na serra de Meira a uma altitude de 750 m e desagua em Portugal, no oceano Atlântico, após um percurso de 300 km. O troço internacional tem uma extensão de 70 km. Em Espanha, os principais afluentes da margem direita do rio Minho, de montante para jusante, são os rios Tamoga, Ladra, Avia, Tea e Louro. Na margem esquerda localizam-se os rios Neira, Sil e Arnoya. Em Portugal, os principais afluentes, de montante a jusante, são os rios Trancoso, Mouro, Gadanha e Coura e que

se localizam na margem esquerda. A parte portuguesa da bacia hidrográfica do rio Minho localiza-se no extremo noroeste de Portugal, entre as coordenadas 41° 45' e 43°40' N e 6°10' e 8°55' O. A área da bacia hidrográfica do rio Minho é de 17 080 km<sup>2</sup>, dos quais 800 km<sup>2</sup> (cerca de 5%) situados em território português. A precipitação média anual é de 1 600 mm, a evapotranspiração média anual 700 mm no litoral e 850 mm no interior e o escoamento médio anual (foz do rio Mouro) é de 600 mm. O caudal médio do ano mais seco (1975/76) foi de 127 hm<sup>3</sup> e o caudal médio do ano mais húmido (1987/88) foi de 501 hm<sup>3</sup> (INAG, 1999c).

O rio Lima nasce em Espanha, na serra de São Mamede a cerca de 950 m de altitude, tem cerca de 108 km de extensão, dos quais 67 km em território português e desagua em Viana do Castelo. O rio está localizado no noroeste de Portugal e as suas coordenadas são 41° 40' N e 08°50' O. A bacia hidrográfica do Lima tem uma superfície de aproximadamente 2 450 km<sup>2</sup>, dos quais cerca de 1 140 km<sup>2</sup> (46,5%) em território português. Nos afluentes na margem direita destacam-se os rios Castro Laboreiro, Labruja e Estorões e na margem esquerda o rio Queijais, Considerando a totalidade da bacia do rio Lima, verifica-se que o escoamento anual médio à entrada de Portugal é de cerca de 1 598 hm<sup>3</sup> e que na foz é de 3 304 hm<sup>3</sup>. Estima-se uma precipitação média anual na bacia de 2 333 mm, correspondendo a 5 574 hm<sup>3</sup>. Deste volume, 2 270 hm<sup>3</sup> perdem-se por evaporação e 2 776 hm<sup>3</sup> infiltram-se, recarregando aquíferos. Resulta, portanto, um escoamento superficial imediato de 528 hm<sup>3</sup>. Dos 2 776 hm<sup>3</sup> que se infiltram, surgem à superfície 2 776 hm<sup>3</sup>, perfazendo um escoamento superficial total de 3304 hm<sup>3</sup> (INAG, 2000b).

O rio Cávado é um rio do norte de Portugal que nasce na Serra do Larouco, a uma altitude de cerca de 1520 m, passa perto de Braga, Barcelo e desagua no Oceano Atlântico junto a Esposende, após um percurso de 135 km. A bacia hidrográfica do rio Cávado é limitada, a norte, pela bacia hidrográfica do rio Lima e, a Este e Sul, pelas bacias do rio Douro e do rio Ave. A bacia está situada segundo as coordenadas 41° 32' 28" N, 8° 47' 36" O e tem uma área de 1600 km<sup>2</sup>. Os principais afluentes são os rios Homem, Rabagão e Saltadouro. O escoamento anual na foz do rio Cávado é, em média, de 2 125 hm<sup>3</sup>. Estima-se uma precipitação média anual na bacia de 2 169 mm, correspondendo a 3 500 hm<sup>3</sup>. Desta quantidade de água, 1 375 hm<sup>3</sup> perdem-se por evaporação e 1 755 hm<sup>3</sup> infiltram-se, recarregando os aquíferos. Resulta, portanto, um escoamento superficial imediato de 370 hm<sup>3</sup>. Os 1 755 hm<sup>3</sup> que se infiltram, surgem à superfície, perfazendo um escoamento superficial total de 2 125 hm<sup>3</sup> (INAG, 2000a).

A bacia hidrográfica do rio Douro está compreendida entre os paralelos 40°20' e 43°10' N e os meridianos 01°43' e 08°40' O, cortando longitudinalmente a Península Ibérica e com orientação dominante Este-Oeste. A sua área total é de 97 603 km<sup>2</sup>, dos quais 18 643 km<sup>2</sup> (19,1%) em território Português e 78 960 km<sup>2</sup> (80,9%) em território Espanhol. O rio Douro nasce na serra de Urbion



(Cordilheira Ibérica), a cerca de 1 700 m de altitude. Ao longo do seu curso de 927 km até à foz no oceano Atlântico, junto à cidade do Porto, atravessa o território espanhol numa extensão de 597 km, seguidamente serve de fronteira ao longo de 122 km, sendo os últimos 208 km percorridos em Portugal. Os principais afluentes do rio Douro em território espanhol são, na margem esquerda os rios Rituerto, Riaza, Duratón, Cega, Pisuerga, Adaja, Zapardiel, Trabancos, Tormes e Huebra, na margem direita, os rios Valderaduey e Esla. Os principais afluentes em território português são, na margem esquerda os rios Águeda, Côa, Torto, Távora, Tedo, Varosa, Teixeira, Cabrum, Bestança, Paiva e Arda, na margem direita, os rios Sabor, Tua, Pinhão, Corgo, Varosa, Tâmega, Sousa e Tinto (INAG, 1999a).

A área da bacia hidrográfica do rio Vouga é de 3 645 km<sup>2</sup> e situa-se entre as coordenadas 40° 41' N, 8° 40' O. O rio Vouga localiza-se na região central de Portugal, nasce a 864 metros de altitude, na Serra da Lapa, mais concretamente no chamado Chafariz da Lapa, situado na freguesia de Quintela, concelho de Sernancelhe, Distrito de Viseu. O seu percurso é, predominantemente, feito de Leste para Oeste tendo um total de 148 quilómetros de extensão. Os seus principais afluentes são Sul, Mau, Antuã e Caima, na margem direita e Águeda na margem esquerda. É represado pela barragem de Ribafeita. A precipitação média anual é de 1390 mm, evapotranspiração média anual de 790 mm, escoamento médio anual de 600 mm, afluência média anual de 2223 hm<sup>3</sup>, o caudal no mês mais seco é 1098 hm<sup>3</sup> e o caudal no mês mais húmido é 2670 hm<sup>3</sup> (INAG, 1999f).

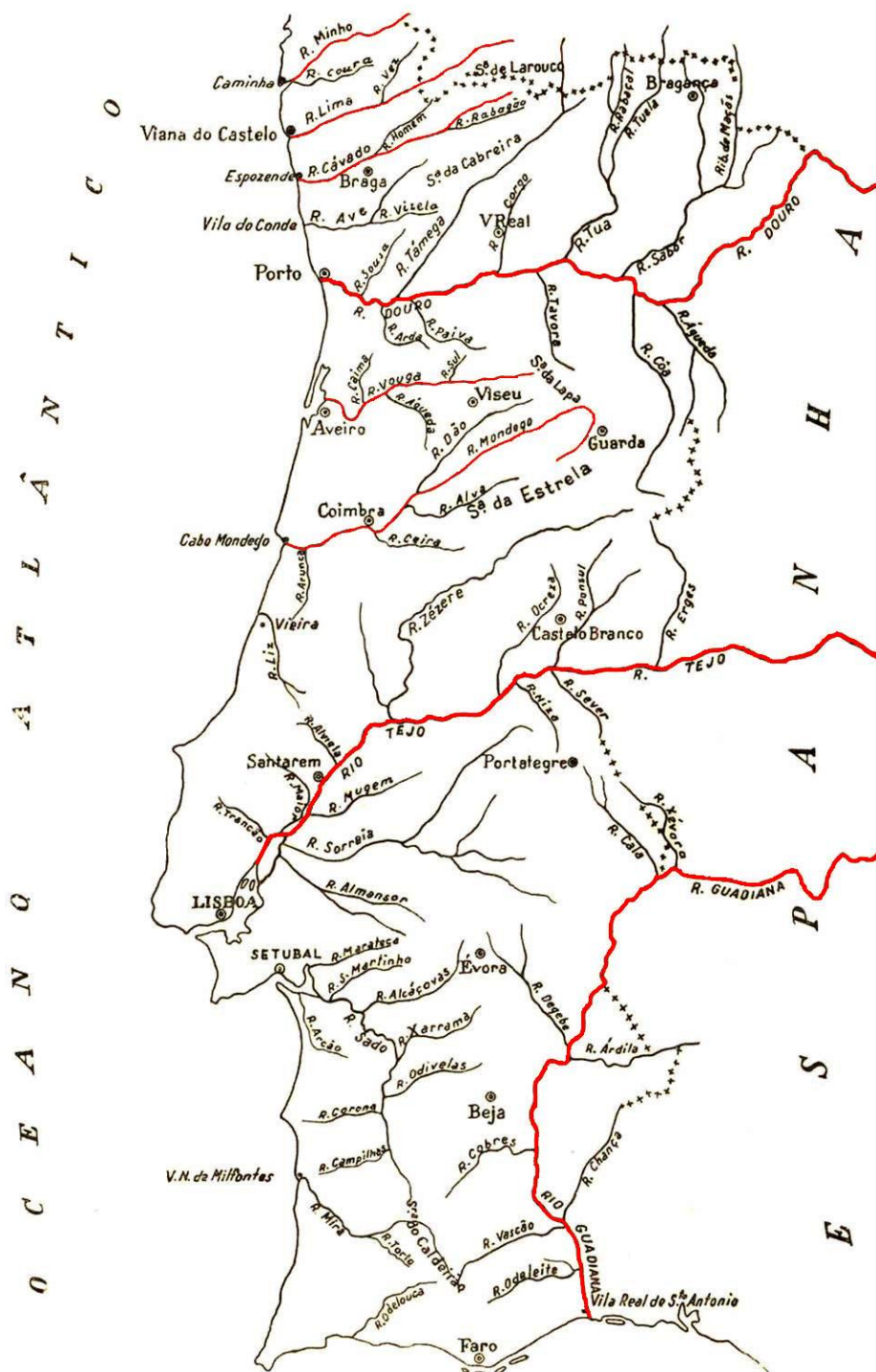


Fig. 3 – Ilustração das bacias hidrográficas Portuguesas Minho, Lima, Cávado, Douro, Vouga, Mondego, Tejo e Guadiana e respectivos afluentes (adaptado de <http://geoapoio.files.wordpress.com/2009/04/rios.jpg>).

A bacia hidrográfica do rio Mondego, a segunda maior bacia integralmente nacional, situa-se na região centro de Portugal, sendo limitada pelos paralelos 39°46' e 40°48' Norte e os meridianos 7°14' e 8°52' Oeste. O rio Mondego nasce na Serra da Estrela a 1547 m de altitude, percorrendo cerca de 300 km até desaguar no Oceano Atlântico junto à Figueira da Foz. A área da bacia hidrográfica do rio Mondego é de 6 645 km<sup>2</sup>. Os principais afluentes são o Dão, na margem direita e Pranto, Arunca, Ceira e Alva na margem esquerda. A precipitação média anual é de 1123 mm, a

evapotranspiração média anual é 720 mm, o escoamento médio anual é 403 mm, a afluência média anual é 2700 hm<sup>3</sup>. O caudal médio no mês mais seco é de 15 hm<sup>3</sup> e o caudal médio no mês mais húmido é de 530 hm<sup>3</sup> (INAG, 1999d).

A bacia do Tejo, cobrindo uma superfície de cerca de 80 629 km<sup>2</sup>, no seu total, dos quais 24 800 km<sup>2</sup> (29,8%) em Portugal, apresenta-se como um largo corredor no centro-este da Península com cerca de 700 km de comprimento e largura média da ordem dos 120 km, sendo a zona central (em Castela-a-Nova e Estremadura espanhola) mais estreita. As coordenadas da bacia do Tejo situam-se de 38° até 41°N e de 01° até 10°O. A nascente localiza-se perto de Albarracín, a cerca de 1600 m de altitude). Nesse *corredor* de 700 km de extensão instala-se o curso principal do Tejo, com cerca de 1100 km, dos quais 230 km em Portugal e 43 km de fronteira. Os seus principais afluentes em Portugal são, na margem direita: Zêzere e esquerda: Sorraia. O valor anual médio da precipitação sobre a bacia do rio Tejo de, aproximadamente, 870 mm (INAG, 1999e).

A bacia hidrográfica do rio Guadiana (37° até 40°N e 02° até 08°O) abrange uma superfície total de 66 800 km<sup>2</sup>, dos quais 55 220 (83%) em Espanha e 11 580 (17%) em Portugal. O rio Guadiana nasce nas lagoas de Ruidera em Espanha, a 1700 m de altitude, desenvolvendo-se ao longo de 810 km até à foz, no oceano Atlântico, entre a cidade portuguesa de Vila Real de Santo António e a cidade espanhola de Ayamonte. Em Portugal, o rio tem um desenvolvimento total de 260 km em Portugal, dos quais 110 km delimitam a fronteira. Os seus principais afluentes em Portugal são, na margem direita: Dejebe e Ribeira do Vascão e, na margem esquerda o Guadiana Alto. A distribuição da precipitação anual média é bastante uniforme, estando normalmente compreendida entre 500 e 600 mm. A evapotranspiração anual varia entre 1200 mm em Contenda e Vila Real de Santo António e 1300 mm em Ameixial, Castro Verde e Beja. O escoamento médio anual em regime natural gerado na totalidade da bacia do Guadiana ronda 6 700 hm<sup>3</sup>, dos quais 1 820 hm<sup>3</sup> são provenientes da parte nacional (157 mm) e 4 900 hm<sup>3</sup> (89 mm) da parte espanhola. (INAG, 1999b).

### **2.3. Ciclo de vida da lampreia-marinha**

A lampreia-marinha segue um ciclo de vida anádromo, dividido em duas fases, a fase larvar de água doce e a fase adulta em ambiente marinho. O desenvolvimento da fase larvar apresenta estágios metamórficos (Youson *et al.*, 1979) que transformam larvas microfágicas, que se alimentam por filtração (algas - diatomáceas), em jovens pelágicos parasíticos - que vivem em ambiente marinho (forma anádroma) (Hardisty, 1979; Doadrio, 2001)). Nos rios habitam locais com fundos pedregosos e de gravilha, preferindo águas límpidas e oxigenadas, pouco profundas e de corrente fraca. As zonas estuarinas são utilizadas na subida e descida para o mar, funcionando como corredor migratório. Quando adultas migram para o mar/oceano onde iniciam a fase de crescimento e

apresentam uma alimentação hematófaga. Quando retornam ao ambiente de água doce, com fins reprodutivos, deixam de se alimentar (Doadrio, 2001). Não foi detectada em albufeiras (Ferreira *et al.*, 2002).

As lampreias marinhas são animais dióicos, a fecundação é externa e o desenvolvimento é indirecto. Há passagem por um estágio larva, chamado amocete, cujas larvas são desprovidas de olhos e de dentes. A duração desta fase, iniciada após a fecundação, pode variar entre diferentes regiões com distintos regimes climáticos (Beamish *et al.*, 1975; Beamish, 1980; Morkert *et al.*, 1998). Em Portugal, a fase larva dura aproximadamente quatro anos (Quintella *et al.*, 2003), permanecendo os amocetes enterrados em fundos de areia ou gravilha (Doadrio, 2001). Os amocetes jovens, com aproximadamente 7 mm de comprimento, absorvem o conteúdo do ovo e, ao fim de 18 a 21 dias após desova, e emergem dos ninhos.

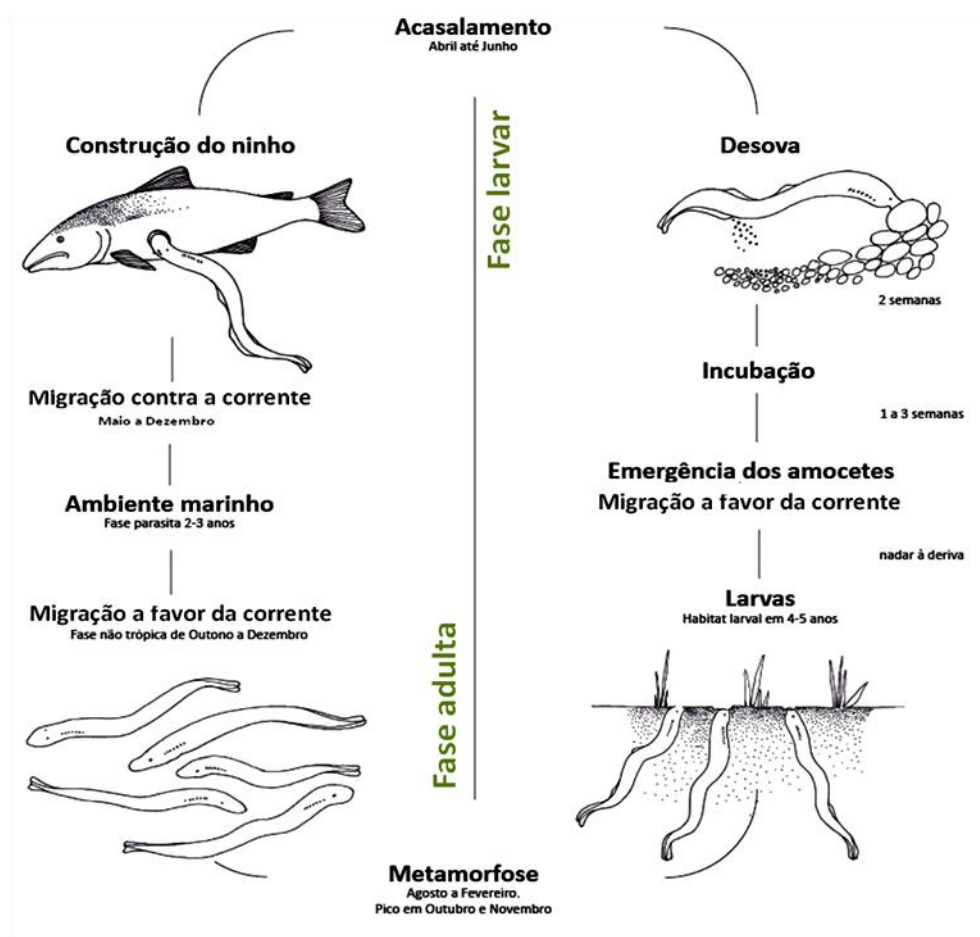


Fig. 4 – Esquema do ciclo biológico da lampreia-marinha (Adaptado de Quintella, 2006 por Brígida Machado)

Os amocetes dispersam-se ao longo do rio a favor da corrente e, sob influência do abrandamento da corrente, depositam-se em áreas de substrato fino, onde podem ficar durante vários anos. Os amocetes alimentam-se por filtração e de um modo não selectivo, na sua maioria microrganismos e partículas orgânicas (Hardisty *et al.*, 1971b) mas também algas (diatomáceas), detritos, protozoários, nemátodes e rotíferos.

Nos rios Portugueses, os amocetes, com 160 mm de comprimento médio, desenvolvem a metamorfose durante o período de Agosto/Setembro até Janeiro/Fevereiro (Quintella *et al.*, 2003). Após um período de dois a cinco anos em água doce e dependendo da localização, a larva sofre um processo de metamorfose para a forma adulta, adaptada ao ambiente marinho (Applegate, 1950; Potter, 1980; Quintella *et al.*, 2003). Em território nacional o processo de metamorfose desencadeia-se no período entre Agosto/Setembro até Janeiro/Fevereiro e está associado com o comprimento médio do animal que é aproximadamente 140mm (Quintella *et al.*, 2003). Este processo depende das reservas lipídicas do animal, que serão usadas como fonte primária no período não trófico, e da variação da temperatura da água. Assim torna-se necessária a acumulação de reservas de energia suficientes para o metabolismo basal e para os rearranjos teciduais inerentes ao processo metamórfico. No fim da metamorfose, as larvas transformadas exibem adaptações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas (Youson, 1980) antes de entrar no lago ou oceano (Beamish, 1980). Na larva pré-metamórfica acontece uma acumulação prenunciada de lípidos em órgãos específicos e a subsequente mobilização de lípidos ao nível de todo o corpo. Ao nível da estratégia metabólica lipídica durante metamorfose de lampreia-marinha podem distinguir-se duas fases. Na primeira fase, desde o estado larvar até  $\frac{3}{4}$  da metamorfose, há uma acumulação predominante de lípidos no fígado e rins e uma depleção lipídica do intestino. A segunda fase, entre  $\frac{3}{4}$  e o 7º estágio, é caracterizado pela mobilização de lípidos do fígado e rins e aumento lípido no intestino, resultante maioritariamente do anabolismo e catabolismo de triacilgliceróis armazenados nas reservas lipídicas e só depois de outras classes de lípidos, colesterol e fosfolípidos. Em suma, os órgãos que sofrem maior transformação são o fígado e os rins e só no fim da metamorfose na alimentação e digestão (Quintella, 2006). Após a metamorfose, as lampreias iniciam a migração para o mar onde permanecem durante 20 a 30 meses (Doadrio, 2001).

A fase adulta ocorre em ambiente marinho e tem uma duração de aproximadamente dois anos (Beamish, 1980). A lampreia é um ectoparasita pouco selectivo, alimentando-se de inúmeras espécies de hospedeiros desde peixes (teleósteos e seláceos), a cetáceos. Algumas das espécies parasitadas são: bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua* L., 1758), arenque do Atlântico (*Clupea harengus harengus*, L., 1758), arinca (*Melanogrammus aeglefinus* L., 1758), escamudo (*Polachius virens* L., 1758), abrótea-vermelha (*Urophycis chuss* Walbaum, 1792), esturjões (*Acipenser* spp.), sarda (*Scomber scombrus* L., 1758), salmão do Atlântico (*Salmo salar* L., 1758), espadarte (*Xiphias gladius* L., 1758), robalo-muge (*Morone saxatilis* Walbaum, 1792), anchova (*Pomatomus saltatrix* L., 1758), atum-rabilho (*Thunnus thynnus* L., 1758) e corvinata-real (*Cynoscion regalis* Bloch & Schneider, 1801), (Beamish, 1980; Farmer, 1980; Halliday, 1991), tubarões (*Cetorhinus maximus* Gunnerus, 1765, Beamish, 1980; *Carcharhinus plumbeus* Nardo, 1827; *Carcharhinus obscurus*

Lesueur, 1818, Jensen & Schwartz, 1994; *Somniosus microcephalus* Bloch & Schneider, 1801, Gallant *et al.*, 2006), cetáceos e baleias (*Eubalaena glacialis* Müller, 1776 Nichols & Hamilton, 2004).

As lampreias marinhas voltam ao rio, com um peso médio de 1,3 kg e 80 cm de comprimento, para iniciar a migração até ao local de acasalamento e desova. A entrada das lampreias nas bacias hidrográficas pode ser influenciada por factores físicos como a temperatura da água, tipo de substrato que constitui o rio e seu caudal (Morman *et al.*, 1980; Young *et al.*, 1990), bem como factores biológicos como a libertação de ácidos biliares pelos amocetes que atraem os ireprodutores (Li *et al.*, 1995). O período de migração reprodutiva varia com a latitude, temperatura da água e caudal do rio (Hardisty *et al.*, 1971b). Em Portugal, a migração inicia-se no período de Dezembro/Janeiro, com um pico em Fevereiro/Março, prologando-se até Maio/Junho, sendo que o período de maior afluência é em Fevereiro/Abril (Almeida *et al.*, 2000). O movimento migratório dá-se preferencialmente à noite. Em zonas de difícil passagem, o movimento caracteriza-se por períodos de intensa actividade de curta duração intercalados com períodos de descanso, nos quais utilizam o disco oral para se fixarem a pedras ou vegetação. Os movimentos migratórios são mais intensos quanto maior o caudal/fluxo do rio devido à elevada taxa de pluviosidade ou ao funcionamento de barragem, se existir. Neste período há um desenvolvimento das gónadas e simultaneamente uma atrofia da maioria dos órgãos e tecidos. A chegada ao local de desova, a construção do ninho e a cópula dependem da temperatura da água, que deve apresentar pelo menos o valor de 15 °C (Applegate, 1950). A latitude e os efeitos climáticos influenciam a duração do processo de acasalamento. Em rios Portugueses, a maior actividade de cópula ocorre entre Maio e Junho (Almeida *et al.*, 2000; Almeida, Quintella and Dias, 2002). Os machos são os primeiros a chegar ao local de acasalamento onde escolhem um local sujeito a pouca acção da luz directa, alguma profundidade, fraca corrente e unidireccional. Os progenitores escavam os ninhos, com aproximadamente um 1m de comprimento, em zonas que o substrato é constituído predominantemente por cascalho, dando-se o posterior acasalamento e construção do ninho (Applegate, 1950; Hardisty, 1986b; Doadrio, 2001).

A lampreia-marinha é geralmente monogâmica. Os ovos e o fluido espermático são libertados pelos progenitores no ninho e ocorre a fecundação. Após o acasalamento, os progenitores morrem devido à exaustão das reservas corporais, ao avançado estado de deterioração corporal, à quebra de mecanismos de regulação metabólica, à ausência de substâncias fundamentais e acumulação de substâncias tóxicas (Larsen, 1980).

## 2.4. Morfologia da lampreia-marinha

A lampreia-marinha pertence aos Agnatas e, como tal, não apresenta mandíbula, possui uma boca semelhante a uma ventosa circular, em posição antero-ventral, e onde estão implantados numerosos dentes suctórios, usados para perfurar a pele dos peixes que lhes servem de alimento, várias placas dentárias e ainda duas placas linguais (Hardisty *et al.*, 1971a). A lampreia-marinha abre e fecha a boca consoante o movimento da língua (Farmer, 1980). Com auxílio da língua, a lampreia-marinha desliza ao longo do corpo dos seus hospedeiros à procura do local apropriado para sefixar e posteriormente alimentar. Através da ventosa fixa-se e novamente com a língua abre um orifício por onde começa a fluir o sangue. Finalmente, utiliza os dentículos do disco bucal para aumentar a aderência ao seu hospedeiro (Farmer, 1980). Nesta situação, é produzida uma substância anticoagulante por uma glândula salivar, que é injectada no ferimento do peixe hospedeiro, mantendo-o aberto. Esta espécie quando inicia a migração reprodutiva deixa de ser parasita. Assim, não se alimentam enquanto adultos, tendo como única função a reprodução (Quintella *et al.*, 2003).



Fig. 4– Ilustração da cavidade bucal da lampreia-marinha (ilustrado por Brígida Machado).

A lampreia-marinha tem um corpo longo, delgado e cilíndrico, comprimido lateralmente na parte posterior, revestido por epiderme estratificada, com glândulas mucosas produtoras de muco, usado como defesa contra os predadores, e sem escamas (Hardisty *et al.*, 1971a). O sistema muscular da lampreia caracteriza-se por uma organização metamérica dando origem a vários miómeros e que se distribuem desde a região craniana até à região genital anal (Hardisty *et al.*, 1971a). O seu esqueleto é cartilágneo e não possui barbatanas pares. Apresentam, todavia, uma barbatana caudal protocérquica e duas barbatanas triangulares e ímpares localizadas na região dorsal (Hardisty *et al.*, 1971a). As lampreias apresentam sete pares de fendas branquiais, posicionadas caudalmente ao olho em ambos os antímeros, e que estão dispostas em série e que permitem a comunicação com o sistema respiratório (Hardisty *et al.*, 1971a). No caso das lampreias, a notocorda encontra-se envolvida por arcos neurais constituindo o eixo de sustentação do corpo. O crânio e arcos viscerais são cartilaginosos. O sistema nervoso apresenta um encéfalo, com 8 ou 10



pares de nervos cranianos, diferenciado mas os órgãos dos sentidos variam com o tipo de animal. As lampreias têm uma boa visão e têm um olfacto e paladar apurados (Hardisty *et al.*, 1971a).

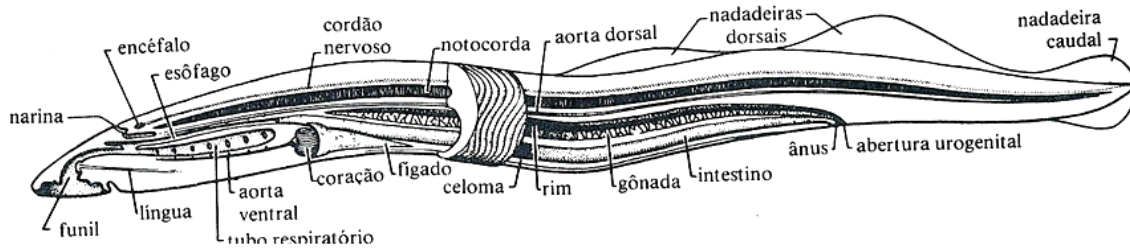


Fig. 5 – Esquema anatômico da lampreia-marinha (adaptado de [http://www.dracena.unesp.br/graduacao/arquivos/zoologia\\_geral/chordata\\_peixes.ppt](http://www.dracena.unesp.br/graduacao/arquivos/zoologia_geral/chordata_peixes.ppt)).

O aparelho digestivo da lampreia-marinha é constituído pela boca, língua, dentes córneos, faringe, esôfago dorsal, intestino, fígado e ânus. O aparelho respiratório inclui brânquias em bolsas saculiformes laterais à faringe. O aparelho excretor é composto por dois rins (mesonefro), um uréter, um seio urogenital e uma papila urogenital. Quanto ao aparelho reprodutor as lampreias possuem uma única gônada e um orifício urogenital sendo a fecundação externa (Hardisty *et al.*, 1971a).

No geral uma lampreia-marinha apresenta um comprimento máximo de 1,2m e um peso máximo de 2,3 Kg (Hardisty, 1986b). Em Portugal, mais especificamente no rio Mondego, durante a migração reprodutora as lampreias marinhas entram na foz com um comprimento médio de 0,88 m (Duarte *et al.*, 2003) e um peso estimado de 1,3 Kg.

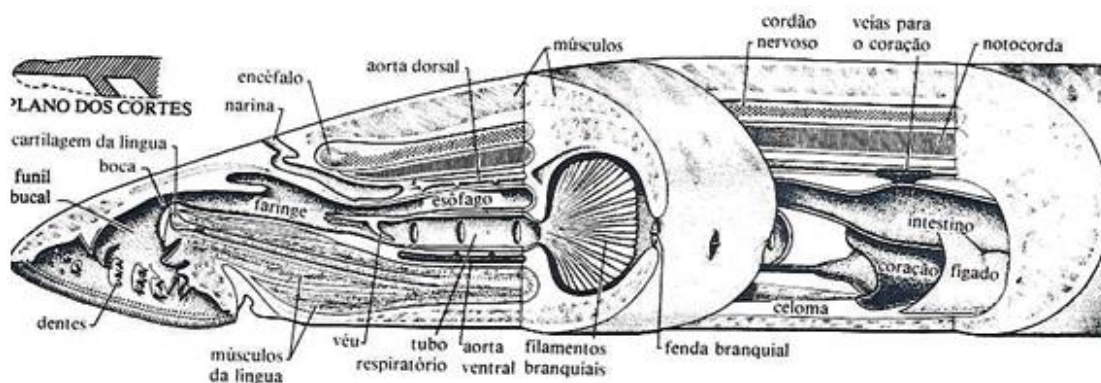


Fig. 6 – Esquema anatômico ampliado da extremidade frontal da lampreia-marinha (adaptado de [http://www.dracena.unesp.br/graduacao/arquivos/zoologia\\_geral/chordata\\_peixes.ppt](http://www.dracena.unesp.br/graduacao/arquivos/zoologia_geral/chordata_peixes.ppt)).

#### 2.4.1. Sistema cardiovascular da lampreia-marinha

Nas lampreias marinhas adultas, o sistema cardiovascular assume um carácter semi-fechado, isto é, apresenta um coração, com duas câmaras, que bombeia a hemolinfa num circuito arterial fechado que sofre anastomoses até às brânquias, onde ocorrem as trocas gasosas. A circulação sistémica, para a distribuição dos nutrientes é feita de forma aberta, sem vasos. A hemolinfa circula no corpo do animal livremente e as células do corpo vão captando os nutrientes. O sistema venoso



com sinusóides e plexos juntamente com as veias assumem a função do quase inexistente sistema linfático (Hardisty *et al.*, 1972).

O coração de lampreia-marinha apresenta um seio venoso, um átrio, um ventrículo e um bulbo arterial. O seio venoso, que recebe sangue das veias cardinais (veia hepática e veia jugular ímpar), tem a forma de tubo e passa entre o ventrículo (do lado direito) e o átrio (do lado esquerdo, no qual termina. O coração está suspenso na cavidade pericardial e é encapsulado por tecido cartilágneo que facilita a função de bomba de sucção quando é recarregado com sangue. Existem válvulas entre os compartimentos do coração mas não existem vasos coronários (Hardisty *et al.*, 1972).

Na lampreia-marinha, a razão entre o peso do coração e o peso corporal assume um valor igual a 0,59, um valor superior ao característico dos vertebrados poiquilotérmicos (entre 0,08 nos peixes; 0,30 nos anfíbios e 0,19 nos répteis) e aproxima-se dos valores determinados nos mamíferos (0,64) (Poupa *et al.*, 1969). Nos vertebrados, este facto está associado ao consumo de oxigénio, logo a lampreia provavelmente apresenta uma elevada taxa de utilização de oxigénio (Poupa *et al.*, 1969). A eficiência no bombeamento de sangue é necessária para o trabalho muscular durante a busca de presas, na migração anádroma e subsequente actividade de desova (Hardisty *et al.*, 1972).

O coração apresenta um suprimento forte em fibras nervosas. Cranialmente ao coração, as fibras nervosas cardíacas deixam o tronco do nervo vago e comunicam na veia jugular média, onde na sua parede formam uma rede solta com um ou dois feixes. Excluindo os ciclóstomos (Mixinas e Lampreias), as fibras musculares que constituem o miocárdio de todas as classes de animais vertebrados não contêm quaisquer células *cromafins* (Gobyryn *et al.*, 1963; Hardisty *et al.*, 1972). As células *cromafins* são células neuroendócrinas, derivadas da crista neural embrionária, encontradas na medula da glândula supra-renal e noutros gânglios do sistema nervoso simpático. O sangue transporta adrenalina e noradrenalina proveniente das glândulas supra-renais. No miocárdio são os nervos simpáticos, as células *cromaffin* a fonte de catecolaminas, como a noradrenalina (Gobyryn *et al.*, 1963).

## **2.5. A importância dos ácidos gordos na lampreia-marinha**

### **2.5.1. Caracterização físico-química e nomenclatura dos ácidos gordos**

Para compreensão do metabolismo dos ácidos gordos em sistemas biológicos é essencial conhecer a sua composição química e função.

Os lípidos são conhecidos por terem propriedades homeostáticas nos seres vivos, quer ao nível do isolamento térmico e depósito de reservas energéticas, quer na estrutura das membranas biológicas, através dos fosfolípidos e esteróis, e em pequenas quantidades, ao funcionarem como cofactores enzimáticos, transportadores de electrões, pigmentos absorventes de luz, âncoras hidrofóbas, agentes emulsionantes, hormonas e mensageiros intracelulares (Berg *et al.*, 2002).

O termo lípidos refere-se a diversos compostos químicos que têm como característica comum o facto de serem insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos (os glicerolípidos são solúveis em soluções contendo ácidos gordos esterificados com grupos hidroxilo e os esfingolípidos em soluções contendo grupos amina). Os lípidos podem ser divididos em dois grupos: lípidos polares, compostos principalmente por fosfolípidos e, lípidos neutros, compostos principalmente por triacilgliceróis (triglicéridos).

Tendo em conta a sua estrutura e propriedades físicas, os lípidos podem ser agrupados nas seguintes classes maioritárias (Voet *et al.*, 1995)(Voet *et al.*, 1995)(Voet *et al.*, 1995)(Voet *et al.*, 1995)(Voet *et al.*, 1995)(Voet *et al.*, 1995)(Voet *et al.*, 1995)(Voet *et al.*, 1995): ácidos gordos, triacilgliceróis, glicerofosfolípidos, esfingolípidos e esteróis (Voet *et al.*, 1995).

Os lípidos simples ou acilgliceróis formam-se pela esterificação de grupos hidroxilo do glicerol ( $\text{CH}_2 \text{OH} - \text{CHOH} - \text{CH}_2 \text{OH}$ ) com grupos ácido carboxílico de ácidos gordos. Os ácidos gordos livres são praticamente inexistentes na célula viva. A composição em resíduos acilo saturados ou insaturados influencia a fluidez das membranas biológicas que aumenta com o grau crescente de insaturação. Os acilgliceróis podem ser mono, di ou triésteres de resíduos acilo e glicerol sendo denominados, de mono, di e triacilgliceróis, respectivamente (Lehninger *et al.*, 1993; Nawar, 1996).

A sua função principal nos organismos vivos é reserva energética (Voet *et al.*, 1995). À temperatura ambiente, os triacilgliceróis podem estar no estado líquido, denominados óleos, ou no estado sólido, denominados gorduras. Os triacilgliceróis dos peixes são invariavelmente óleos. Na células viva, os mono e os diacilgliceróis são intermediários metabólicos da síntese de fosfolípidos, enquanto os triacilgliceróis constituem a principal forma de energia química armazenada nos tecidos animais.

Os glicerofosfolípidos são os constituintes maioritários das membranas celulares. São lípidos compostos derivados do glicerol por esterificação dos carbonos C1 a resíduos acilo saturados C2, a resíduos acilo insaturados e C3 ao grupo fosfato ligado à colina, etanolamina ou outro grupo constituinte. Devido à presença do grupo fosfato são moléculas anfipáticas com uma extremidade não polar alifática e uma extremidade polar.

Os esfingolípidos também são um dos constituintes maioritários das membranas celulares. Derivam de amino-álcoois C18 como a esfingosina e di-hidroesfingosina, por esterificação de resíduos acilo com o seu grupo amina. Os derivados metabólicos mais frequentes deste tipo de compostos são a esfingomielina da bainha de mielina dos axónios, os cerebrosídeos das membranas neuronais do cérebro e os gangliosídeos, componentes primários da superfície membranar das células nervosas e constituinte significativo dos lípidos cerebrais (6%).

Os esteróis são derivados do ciclopentanoperihidrofenantreno. O esterol mais importante e mais simples (não apresenta ácidos gordos na sua constituição) é o colesterol. Este encontra-se em maior concentração nas membranas plasmáticas animais e também funciona como precursor de hormonas esteróides, ácidos e sais biliares (Voet *et al.*, 1995).

Os ácidos gordos são designados com base no comprimento da sua cadeia, grau de insaturação (numero de ligações duplas ou etilénicas) e posição das ligações duplas. A nomenclatura, utilizada neste estudo para identificar ácidos gordos, é descrita segundo a formula CA: B $\omega$ -X, em que A representa o número de átomos de carbono (C), B o número de duplas ligações e X a posição da dupla ligação em relação à extremidade terminal com o grupo metilo. Por convenção, os ácidos gordos saturados (em inglês, SFA) não possuem nenhuma ligação dupla e os ácidos gordos monoinsaturados (em inglês, MUFA) têm somente uma ligação dupla. Os ácidos gordos poliinsaturados (em inglês, PUFA) contêm duas ou mais ligações duplas separadas por um único grupo metileno (CH<sub>2</sub>). Assim, C14:0 e C16:0 designam ácidos gordos saturados com 14 e 16 átomos de carbono, respectivamente e sem ligações duplas. Os ácidos gordos 18:1 $\omega$ 9 e 18:1 $\omega$ 7 são monoinsaturados pois apresentam 18 átomos de carbono cujas únicas ligações duplas se encontram nas posições dos átomos de carbono 9 e 7, respectivamente, a contar desde a extremidade metilo da molécula. Se a contagem for feita da extremidade carboxilo estes ácidos gordos serão escritos 18:1 $\Delta$ 9 e 18:1 $\Delta$ 11, respectivamente. A designação de uma estrutura particular de PUFA pode ser definida pela posição da primeira ligação dupla relativamente à extremidade constituída pelo grupo metilo. No ácido gordo C18:3 $\omega$ 3 (18:3 $\Delta$ 9,12,15) a ligação dupla encontra-se no terceiro carbono a contar da extremidade metilo da molécula. Do mesmo modo, C20:5 $\omega$ 3 representa 20:5 $\Delta$ 5,8,11,14,17 e C22:6 $\omega$ 3 representa 22:6  $\Delta$  4,7,10,13,16,19. Os ácidos gordos com ligações duplas podem apresentar-se com duas configurações, a *cis* e a *trans*. A mais frequente é a *cis*, em que a cadeia de carbonos está do mesmo lado da ligação dupla. Na configuração *trans* a cadeia de carbonos está em lados opostos da ligação dupla. As ligações duplas em ácidos gordos de peixe estão frequentemente na configuração *cis*, no entanto a configuração *trans* nas ligações etilénicas pode aparecer, por exemplo, no ácido elaídico, o isómero *trans* do ácido oleico. Os enzimas que dessaturam ácidos

gordos inserindo duplas ligações nos carbonos 5 e 6 desde a extremidade com o grupo carboxilo são designadas por insaturases  $\Delta 5$  e  $\Delta 6$ , respectivamente (Tocher, 2002).

**Quadro 1 – Designação química (A), comum (B) e sistemática (C) de alguns ácidos gordos saturados e respectiva fórmula molecular (D).**

A	B	C	D
C2:0	Ácido acético	Ácido etanóico	CH <sub>3</sub> COOH
C3:0	Ácido propiónico	Ácido propanóico	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> COOH
C4:0	Ácido butírico	Ácido butanóico	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH
C5:0	-	Ácido pentanóico	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH
C6:0	Ácido capríco	Ácido hexanóico	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH
C7:0	-	Ácido heptanóico	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> COOH
C8:0	Ácido caprílico	Ácido octanóico	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COOH
C9:0	-	Ácido nonanóico	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> COOH
C10:0	Ácido cáprico	Ácido decanóico	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> COOH
C11:0	-	Ácido undecanóico	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> COOH
C12:0	Ácido láurico	Ácido dodecanóico	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> COOH
C13:0	-	Ácido tridecanóico	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> COOH
C14:0	Ácido merístico	Ácido tetradecanóico	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> COOH
C15:0	-	Ácido pentadecanóico	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>13</sub> COOH
C16:0	Ácido palmítico	Ácido hexadecanóico	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> COOH
C17:0	Ácido margárico	Ácido heptadecanóico	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>15</sub> COOH
C18:0	Ácido esteárico	Ácido octadecanóico	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> COOH
C19:0	-	Ácido nonadecanóico	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>17</sub> COOH
C20:0	Ácido araquídico	Ácido eicosanóico	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>18</sub> COOH
C21:0	-	Ácido heneicosanóico	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>19</sub> COOH
C22:0	Ácido behénico	Ácido docosanóico	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>20</sub> COOH
C23:0	-	Ácido tricosanóico	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>21</sub> COOH
C24:0	Ácido linolénico	Ácido tetracosanóico	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>22</sub> COOH

**Quadro 2 – Designação química (A), comum (B) e sistemática (C) de alguns ácidos gordos monoinsaturados.**

A	B	C
C14:1 $\omega$ 5	Ácido miristoleico	Ácido cis-9-tetradecenóico
C16:1 $\omega$ 7	Ácido palmitoleico	Ácido cis-9-hexadecenóico
C18:1 $\omega$ 12	Ácido petroselinico	Ácido cis-6-octadenóico
C18:1 $\omega$ 7	Ácido cis-vacénico	Ácido cis-11-octadecenóico
C18:1 $\omega$ 9	Ácido oleico	Ácido cis-9-octadecenóico
C20:1 $\omega$ 9	Ácido gondoico	Ácido cis-11-eicosenóico
C22:1 $\omega$ 9	Ácido erúcico	Ácido cis-13-docosenóico
C24:1 $\omega$ 9	Ácido nervónico	Ácido cis-15-tetracosenóico

**Quadro 3 – Designação química (A), comum (B) e sistemática (C) de alguns ácidos gordos poliinsaturados.**

A	B	C
C18:2 $\omega$ 6	Ácido linoleico	Ácido cis-9,12-octadecadienóico
C18:3 $\omega$ 3	Ácido $\alpha$ -linolénico, ALA	Ácido cis-9,12,15-octodecatrienóico
C18:3 $\omega$ 6	Ácido $\gamma$ -linoleico	Ácido cis-6,9,12-octadecadienóico
C20:3 $\omega$ 6	Ácido homo- $\gamma$ -linoleico	Ácido cis-8,11,14-eicosatrienóico
C20:4 $\omega$ 6	Ácido araquidónico, AA	Ácido cis-5,8,11,14-eicosatetrienóico
C20:5 $\omega$ 6	Ácido docopentanóico	Ácido cis-4,7,10,13,16-Ácido docopentanóico
C18:3 $\omega$ 3	Ácido $\alpha$ -linolénico	Ácido cis-9,12,15-octodecatrienóico
C20:5 $\omega$ 3	Ácido eicosapentanóico, EPA	Ácido cis-5,8,11,14,17-eicosapentanóico
C22:5 $\omega$ 3	Ácido docosahexanóico, DPA	Ácido cis-7,10,13,16,19-dodesapentanóico
C22:6 $\omega$ 3	Ácido docohexanóico, DHA	Ácido cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico

### 2.5.2. Metabolismo dos ácidos gordos

Os ácidos gordos são fisiologicamente importantes como componentes de fosfolípidos e glicolípidos, como modificadores hidrófilos de proteínas, como modeladores da expressão genética nuclear, como fonte de energia, como hormonas ou mensageiros intracelulares (Vusse *et al.*, 1992; Berg *et al.*, 2002; Tocher, 2003).

#### 2.5.3.1. Digestão, absorção e transporte

Pode-se considerar que o catabolismo lipídico se inicia com a digestão, processo de decomposição de nutrientes complexos em moléculas simples como os ácidos gordos, consequente absorção, pelo epitélio intestinal e transporte para o fígado onde serão processados (Cunningham, 1999). Os ácidos gordos podem também ser biossintetizados *de novo* a partir da glucose, facto que garante a existência de duas vias distintas de mobilização de lípidos: a via exógena, que tem a sua origem na dieta e a via endógena, na qual os ácidos gordos são sintetizados a partir de intermediários não lipídicos, como a glucose, via piruvato - acetil-CoA (Cunningham, 1999; Berg *et al.*, 2002).

A maioria dos lípidos é ingerida sob forma de triacilgliceróis cuja decomposição em moléculas mais simples tem início no estômago, sob acção química e mecânica e termina no intestino delgado, sob a acção química de diversos enzimas e acção detergente dos sais biliares e fosfolípidos (Cunningham, 1999). Os triacilgliceróis no lúmen intestinal são, então, incorporados em micelas formadas por sais biliares, moléculas anfipáticas sintetizadas a partir do colesterol hepático e secretadas pela vesícula biliar. Esta incorporação orienta as ligações éster dos ácidos gordos para a superfície da micela expondo-os à acção digestiva das lipases pancreáticas (Berg *et al.*, 2002). Nos peixes, a actividade hidrolítica é geralmente efectuada na porção proximal do intestino (i.e., duodeno) diminuindo a actividade digestiva gradualmente ao longo do tubo digestivo. Nos peixes, o pâncreas ou o hepatopâncreas assume-se como a maior fonte de enzimas lipases que podem também ser secretadas pelas células da mucosa intestinal (Tocher, 2003). A lipase hidrolítica pancreática e co-enzima colipase cooperam na digestão dos triacilgliceróis em acilgliceróis, diacilgliceróis, glicerol e predominantemente, 2-monoacilgliceróis. Estas actuam predominantemente nas posições sn-1 e sn-3 das ligações éster de triacilgliceróis. As lipases não actuam sobre fosfolípidos e éster de colesterol. Os fosfolípidos da dieta são digeridos por fosfolipases A<sub>2</sub> (Six *et al.*, 2000). Estes enzimas catalisam a hidrólise específica da ligação sn-2 dos fosfolípidos, libertando um resíduo acilo e um lisofosfolípido (glicerofosfolípidos). O enzima colesterol esterase também digere lípidos, libertando produtos como resíduo acilo e colesterol (Lehninger *et al.*, 1993; Nawar, 1996).

Nos peixes, os resíduos acilo de cadeia longa (> 12 átomos de carbono) e os 2-monoacilgliceróis são absorvidos pelos enterócitos ao longo de todo o intestino, onde são reesterificados em triacilgliceróis. Este transporte é efectuado por difusão passiva (Tocher, 2003) mas com o auxílio de micelas, localizadas na membrana apical dos enterócitos. A difusão passiva nos peixes a uma taxa inferior à dos mamíferos é devido à baixa temperatura corporal que fortemente influencia a taxa de digestão dos nutrientes (Kapoor *et al.*, 1975). Estudos recentes, para avaliar a absorção de resíduos acilo utilizando enterócitos isolados de truta, mostraram que a taxa de absorção nos ácidos gordos C20:4 $\omega$ 6, C20:5 $\omega$ 3 e C22:6 $\omega$ 3, provenientes dos triacilgliceróis, é menor comparativamente com os ácidos gordos C16:0, C18 $\omega$ 9, C18:2 $\omega$ 6 e C18:3 $\omega$ 3 (Perez *et al.*, 1999). Contudo, nos ácidos gordos totais aqueles que apresentam taxa de absorção mais elevada são os ácidos gordos altamente insaturados e o ácido gordo C16:0, derivados dos fosfoglicéridos.

Nas células da mucosa intestinal os triacilgliceróis e os fosfoglicéridos são ressintetizados, por reacções de esterificação, e empacotados, no reticulo endoplasmático, em lipoproteínas anfipáticas sintetizadas no intestino, as quilomicra e raramente as VLDL (lipoproteínas de muito baixa densidade) (Glatz *et al.*, 1997; Berg *et al.*, 2002). As quilomicra são estruturas esféricas com a parte central hidrofóbica e a periférica hidrofílica, são responsáveis pelo transporte dos lípidos absorvidos na dieta para a corrente sanguínea e posteriormente para os vários órgãos e tecidos, como o fígado, músculo e tecido adiposo. A disponibilidade lipídica e o grau de insaturação dos ácidos gordos afectam a produção das lipoproteínas. Uma dieta rica em ácidos gordos poliinsaturados leva à produção de uma elevada quantidade de quilomicra, enquanto uma dieta rica em ácidos gordos saturados produz pequenas partículas VLDL. Nos peixes, as lipoproteínas intestinais pode ser transportadas pelo sistema linfático antes de passarem para a corrente sanguínea e só depois são libertadas no fígado (Sheridan *et al.*, 1985). No entanto, uma parte das lipoproteínas pode ser transportada directamente ao fígado via sistema porta. Os triacilgliceróis são degradados por acção de lipases a resíduos acilo para migrarem para o interior da célula. Uma vez no interior do adipócito ou do miócito, os ácidos gordos são armazenados como triacilgliceróis no tecido adiposo ou oxidados para gerar ATP de acordo com as necessidades do organismo (Vusse *et al.*, 1992; Berg *et al.*, 2002).

Nos peixes, entrada destas lipoproteínas nos tecidos pode ocorrer por endocitose, mediada por receptores, por pinocitose não específica ou pela interacção directa com as células endoteliais das membranas celulares. O coração apresenta baixa capacidade para efectuar síntese *de novo* (Hasselbaink *et al.*, 2002) e em condições fisiológicas normais de oxigenação os ácidos gordos de cadeia longa são substratos importantes da oxidação na estrutura membranar, após a sua esterificação em fosfolípidos e em vias de transdução de sinal (Van der Vusse *et al.*, 1992; Van Bilsen *et al.*, 1998). Devido à sua baixa solubilidade em água, estes ácidos gordos são transportados para o

coração ligados a proteínas, como albumina, ou ligados de modo covalente ao núcleo triacilglicérico de lipoproteínas circulantes, quilomicra e VLDL. Depois da dissociação do complexo albumina-ácido gordo ou hidrólise dos triacilgliceróis, os ácidos gordos são transferidos do lúmen capilar através do endotélio capilar e compartimento intersticial para as células do músculo cardíaco (Bassingthwaighe *et al.*, 1987; Van der Vusse *et al.*, 1998). Subsequentemente, os ácidos gordos passam por difusão para o sarcolema e citoplasma para serem convertidos em ácidos gordos acil-CoA na membrana externa das mitocôndrias ou no retículo endoplasmático (Zakim, 2000). Na disponibilização de energia para a actividade muscular, os ácidos gordos são activados pelo CoA e são transportados, pela carnitina, do espaço intermembranar para a matriz mitocôndrial, onde são oxidados. A degradação de ácidos gordos converte um composto alifático num conjunto de unidades acetil-CoA que podem ser seguidamente processadas no ciclo do ácido cítrico (Vusse *et al.*, 1992; Berg *et al.*, 2002; Tocher, 2003).

#### **2.5.3.2. Catabolismo e Biossíntese dos ácidos gordos**

O catabolismo dos ácidos gordos fornece energia para as células do músculo cardíaco de muitas espécies de peixe e este processo é semelhante ao dos mamíferos. O mecanismo de degradação de ácidos gordos ocorre em organelos celulares, como as mitocôndrias e os peroxissomas, via um conjunto complexo de enzimas. O processo mais frequente de degradação de ácidos gordos ocorre nas mitocôndrias e denomina-se  *$\beta$ -oxidação* (Figura 8). Este envolve a clivagem sequencial de duas unidades de carbono, libertando moléculas acetil-CoA, através de uma série cíclica de reacções catalisadas por inúmeros enzimas com actividades distintas. A  *$\beta$ -oxidação* é uma importante fonte de energia para vários tecidos de peixe, incluindo músculo cardíaco e músculo vermelho, mas também músculo branco, como foi recentemente demonstrado no salmão Atlântico (Froyland *et al.*, 1998). A oxidação mitocôndrial de ácidos gordos é um processo multifactorial regulado pelo malonil-CoA, pela razão acetil CoA/CoA e NADH/NAD<sup>+</sup> (Van der Vusse *et al.*, 1992).

Por exemplo o ácido palmítico constituído por 16 átomos de carbono (8 pares de carbonos) necessita de sete ciclos de  *$\beta$ -oxidação* para a sua degradação completa com formação de 8 acetil-CoA. Os produtos acetil-CoA serão posteriormente canalizados para o ciclo do ácido cítrico (Figura 9).

A  *$\beta$ -oxidação* dos ácidos gordos saturados nos mitocôndrios, com número par de átomos de carbono origina exclusivamente acetil-CoA. Nos ácidos gordos que têm número ímpar de carbonos, juntamente aos s acetil-CoA formados no decorrer dos ciclos de transformação, forma-se na reacção final um acil-CoA com três carbonos, o propionil-CoA, que será transformado em succinil-CoA, cujo destino metabólico preferencial será o ciclo do ácido cítrico (Berg *et al.*, 2002).

A  $\beta$ -oxidação nos ácidos gordos insaturados decorre como a  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos saturados até à dupla ligação, onde um passo de izomerização *cis-trans* seguida por migração  $\beta$ - $\alpha$  permite o recomeço da  $\beta$ -oxidação, transformações acessórias que envolvem a participação de um enzima mitocondrial.

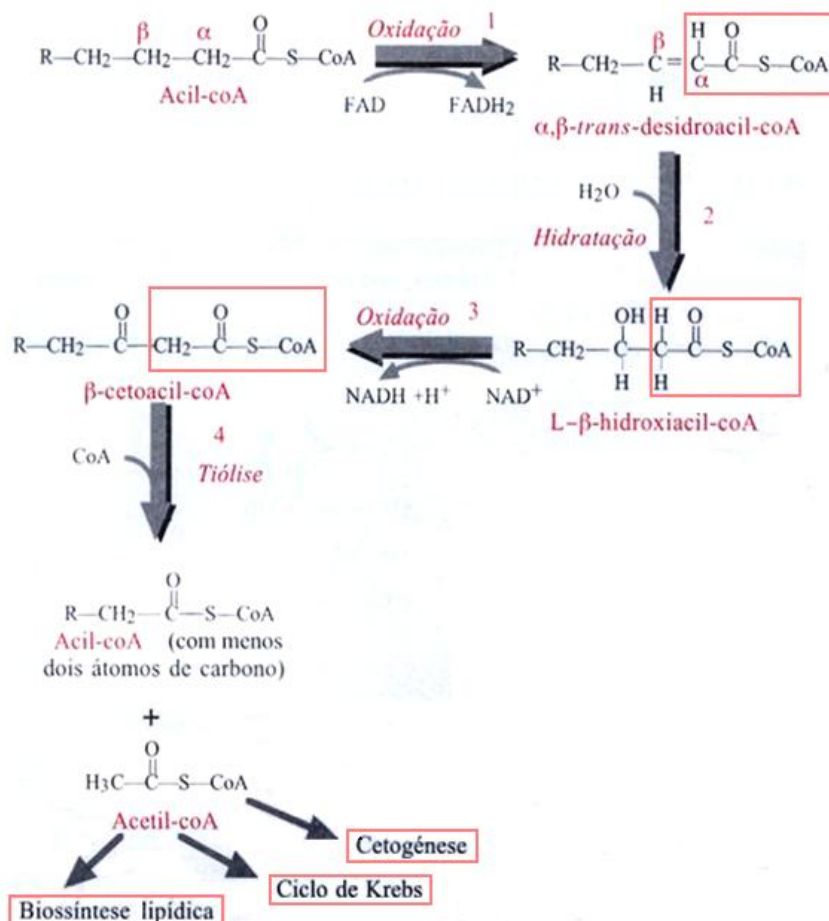


Fig. 7 –  $\beta$ -oxidação de ácidos gordos mitocondrial (Campos, 1998).

Em geral, grande parte do acetil-CoA gerado pela  $\beta$ -oxidação mitocondrial hepática dos ácidos gordos é convertida em acetoacetato e  $\beta$ -hidroxibutirato, também denominados corpos cetónicos. Estes compostos podem ser usados pelo coração e pelos músculos esqueléticos para produzir energia. O cérebro, que normalmente depende da glucose como fonte de energia, pode também utilizar corpos cetónicos em períodos de jejum prolongado, em geral superior a 2-3-dias. A síntese de corpos cetónicos começa pela condensação de duas moléculas de acetil-CoA, para formar acetoacetil-CoA. A condensação de outra molécula de acetil-CoA produz 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA). O HMG-CoA é então degradado a acetoacetato e acetil-CoA. O acetoacetato assim produzido passa para a corrente sanguínea e é distribuído pelos tecidos. Uma vez absorvido, reage na mitocôndria com o succinil-CoA, produzindo succinato e acetoacetil-CoA, que pode ser clivado em duas moléculas de acetil-CoA (Halpern, 1997).



O balanço energético de um ciclo de  $\beta$ -oxidação é altamente positivo, o que explica o papel dos lípidos como reserva energética (Quadro 4). No caso do ácido palmítico formar-se-iam 130 moléculas de ATP [(14 ATP + 21 ATP + 96 ATP) - 1] que é muito superior às 38 moléculas de ATP formadas a partir de uma molécula de glicose. Com base no peso, o rendimento energético da  $\beta$ -oxidação dos ácidos gordos é cerca do dobro do rendimento de degradação de glicose em aerobiose (37,674 kJ/g de gordura contra 16,444 kJ/g de glícidos ou proteínas (Berg *et al.*, 2002).

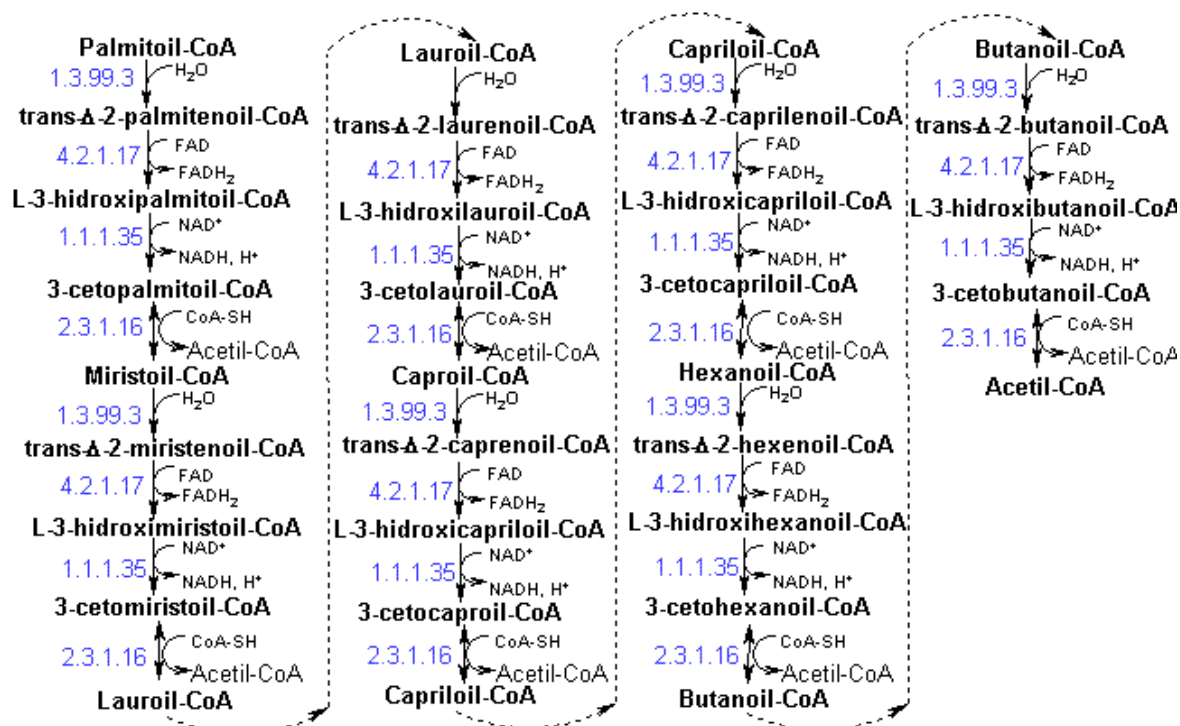


Fig. 8 –  $\beta$ -oxidação completa do ácido palmítico (<http://www.bioq.unb.br>).

Quadro 4 – Balanço energético de um ciclo de  $\beta$ -oxidação.

Etapa	ATP formados	ATP gastos
Activação	-	1
1ª desidrogenação	2 (A/2-1)	-
2ª desidrogenação	3 (A/2-1)	-
Acetil-CoA	12 (A/2)	-

A  $\beta$ -oxidação peroxissomal é especificamente utilizada no encurtamento inicial de ácidos gordos com cadeias longas, altamente insaturadas ou mesmo em ácidos gordos não comuns antes da  $\beta$ -oxidação convencional efectuada nas mitocôndrias. Esta foi observada em músculo vermelho no salmão Atlântico e pode representar até 30 % das reacções de  $\beta$ -oxidação hepáticas (Crockett *et al.*, 1993).

O catabolismo de ácidos gordos saturados com número par de carbonos ocorre por  $\beta$ -oxidação. Esta inicia-se aquando da activação dos ácidos gordos por combinação com a molécula coenzima A (CoA), sendo a única reacção deste processo que necessita de ATP (figura 7), cujo enzima

responsável é a acil-CoA sintetase ou tiocinase. É uma reacção extra-mitocôndrial pois efectua-se no retículo endoplasmático ou na fase externa da membrana mitocôndrial (Halpern, 1997; Berg *et al.*, 2002). A  $\beta$ -oxidação continua após o transporte dos acil-CoA através da membrana da mitocôndria. Para tal, os acil-CoA combinam-se com um transportador, a carnitina, formando a molécula acilcarnitina pela acção da acilcarnitina transferase I, situada na face externa da membrana interna das mitocôndrias. A actividade deste enzima é inibida pelo malonil-CoA, um intermediário da lipogénese. No interior das mitocôndrias, os intermediários da acilcarnitina transformam-se nos respectivos acil-CoA pela acção da acetilcarnitina transferase II. Poder-se-ia pensar que este sistema poderia estar limitado pela carnitina disponível. Todavia, tal não acontece porque está acoplado a um sistema de transferência de acetil-CoA através das acetilcarnitina transferases I e II (Rehbein, 1990; De Windt *et al.*, 2001; Berg *et al.*, 2002).

O mecanismo da  $\beta$ -oxidação continua com uma desidrogenação, pela acção da acil-CoA desidrogenase formando-se um acil-CoA insaturado. Este enzima é uma flavoproteína cujo cofactor enzimático é o FAD (dinucleótido de flavida e adenina) que oxida o ácido gordo activado introduzindo-lhe a dupla ligação. Segue-se uma hidratação, pela acção da enoil-coA hidratase, para introduzir uma molécula de oxigénio, formando-se um  $\beta$ -hidroxiacil-CoA. A segunda desidrogenação do carbono  $\beta$  é efectuada pela acção da  $\beta$ -hidroxiacil-CoA hidratase com formação de uma cetona, o  $\beta$ -cetoacil-CoA. Os hidrogénios são captados pelo  $\text{NAD}^+$  com a consequente formação de energia. A cetona formada na reacção anterior criou um ponto fraco na molécula e quatro fragmentos de carbono são clivados pela tiolase em acetil-CoA e uma cadeia de ácido gordo acil-CoA com menos dois carbonos, com a introdução de mais uma molécula de CoA. As moléculas  $\text{FADH}_2$  e  $\text{NADH}$  formadas nos passos de oxidação transferem os seus electrões para a molécula de oxigénio por meio da cadeia respiratória, enquanto o acetil-CoA formado normalmente entra no ciclo do ácido cítrico por condensação com o oxaloacetato. O acil-CoA sofre outra  $\beta\beta$ -oxidação com formação de um acil-CoA com menos dois átomos de carbono, repetindo-se a operação até haver apenas acetil-CoA. Trata-se, portanto de um ciclo repetitivo em que cada ciclo se forma um ácido gordo com menos dois átomos de carbono, ficando na última reacção apenas dois carbonos sob forma de acetil-CoA (De Windt *et al.*, 2001; Berg *et al.*, 2002). Segundo a nomenclatura CA:Bw-X, em que A representa no numero de átomos de carbono (C), haverá  $(A/2)-1$  ciclos, formando-se  $A/2$  acetil-CoA (Berg *et al.*, 2002).

A  $\beta$ -oxidação peroxissomal é especificamente utilizada no encurtamento inicial de ácidos gordos de cadeia longa, altamente insaturadas, com 10 a 22 átomos de carbono, como acontece com o ácido erúico, ou mesmo ácidos gordos menos comuns, antes da  $\beta$ -oxidação convencional ocorrer nas mitocôndrias. Este processo é semelhante à  $\beta$ -oxidação mitocôndrial apesar de mostrar algumas

diferenças entre os dois processos: os ácidos gordos difundem-se livremente para dentro do peroxissoma, sem serem transportados pela carnitina seguindo os produtos de oxidação para a mitocôndria; a oxidação dos acil-CoA não envolve o FAD, mas pelo dioxigénio, gerando peróxido de hidrogénio; a tiolase peroxissomal não reconhece acil-CoA com menos de 8 carbonos tornando a degradação de ácidos gordos no peroxissoma incompleta (Berg, 2002 #2). Esta via também foi detectada no músculo vermelho do salmão Atlântico, onde pode atingir 30 % da  $\beta$ -oxidação hepática (Crockett *et al.*, 1993).

A lipogénese é um termo usado para descrever reacções biossintéticas endógenas que levam à formação *de novo* de ácidos gordos. Em situações de abundância de acetil-CoA, o fígado e o tecido adiposo sintetizam ácidos gordos. O processo de síntese apresenta bastantes semelhanças com o inverso da  $\beta$ -oxidação, mas também tem diferenças importantes: ocorre no citoplasma, e não na mitocôndria; usa NADPH como fonte de equivalentes redutores e o transportador de resíduos acilo é a ACP, proteína transportadora de resíduos acilo, e não o CoA (Berg *et al.*, 2002).

A principal fonte de carbono para a síntese de novos ácidos gordos é o acetil-CoA formado na mitocôndria pela descarboxilação oxidativa do piruvato ou por degradação oxidativa de alguns aminoácidos (Berg *et al.*, 2002). Nos peixes, a lipogénese é catalisada no citoplasma pelo complexo multienzimático ácido gordo sintetase (FAS) (Sargent, 1989). Os produtos são, na sua maioria, ácidos gordos saturados C16:0, ácido palmítico e C18:0, ácido estereático, os quais podem ser biossintetizados *de novo* em todos os organismos, inclusive nos peixes (Tocher, 2003).

A síntese dos ácidos gordos saturados pode ser mediada por dois sistemas: o sistema extra-mitocôndrial, que converte acetil-CoA em ácidos gordos de cadeia longa, na presença de ATP, CO<sub>2</sub>, Mn<sup>2+</sup> e NADPH, no citoplasma e, o sistema intra-mitocôndrial, que alonga ácidos gordos do citoplasma, por adições sucessivas de acetil-CoA, utilizando NADH e NADPH como doadores de equivalentes redutores. O segundo mecanismo não se trata bem de síntese, mas antes de alongamento da cadeia de ácidos gordos sintetizados no citoplasma. Assim, a principal via de síntese de ácidos gordos na maior parte dos tecidos decorre no citoplasma celular (Halpern, 1997; Berg *et al.*, 2002).

No citoplasma, a biossíntese *de novo* inicia-se na presença de monómeros com grupos acil activados, na maioria, unidades acetilo e unidades malonilo. O acetil-CoA é carboxilado dando origem a um fragmento com quatro carbonos, o malonil-CoA, pela acetil-CoA carboxilase na presença de ATP. Este enzima tem como coenzima a biotina e existe sob duas formas: dimérica inactiva e polimérica activa. O citrato induz a formação do polímero e o malonil ou palmitoil-CoA induzem a sua despolimerização (Halpern, 1997; Berg *et al.*, 2002).

O enzima é activo quando desfosforilado pela acção estimulante da hormona insulina, que inibe a lipólise. A sua actividade é inibida, na forma fosforilada, pela acção das hormonas glucagina e adrenalina. Os intermediários da síntese dos ácidos gordos estão ligados covalentemente aos grupos sulfidrilo de uma proteína transportadora de acilo (ACP): acetil+ACP e malonil+ACP. Estes intermediários sofrem condensação para formar acetoacetil+ACP, com libertação de CO<sub>2</sub> pela unidade activada do malonil. Este fragmento é reduzido, desidratado e novamente reduzido passando de um grupo carbonilo a um grupo metileno com formação de butiril+ACP (Figura 10) (Berg *et al.*, 2002).

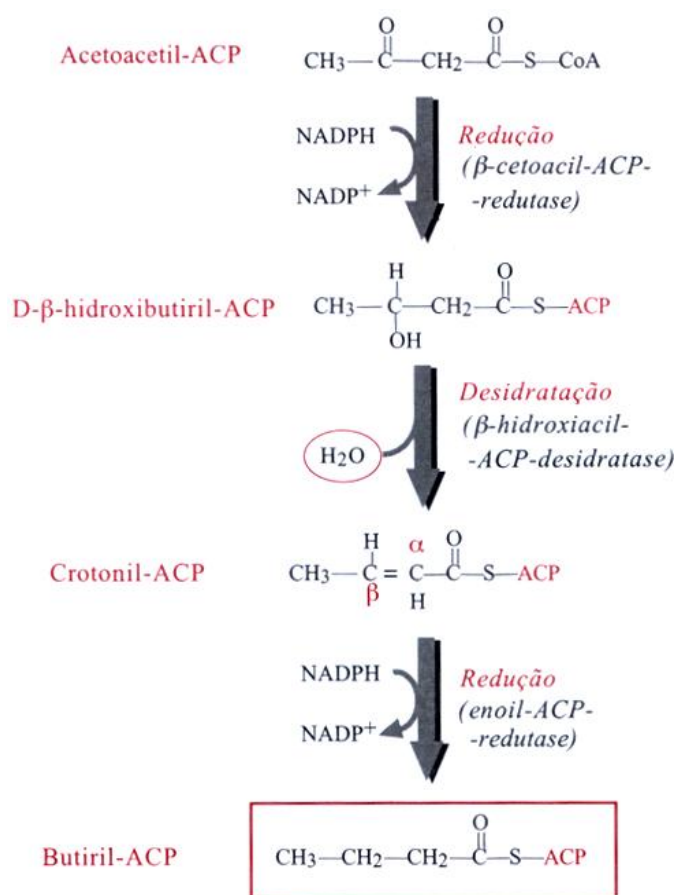


Fig. 9 – Reacções de transformação do acetoacetil-ACP em butiril-ACP, no citoplasma (Campos, 1998).

O NADPH é o agente redutor. Outro grupo malonil activado condensa com o grupo butiril+ACP e o alongamento é repetido até a síntese do complexo terminar, por exemplo, com a formação do palmitato (C16). Assim, a cadeia de ácidos gordos é alongada pela adição sequencial de unidades com dois carbonos, sendo necessários sete passos de alongamento para síntese do palmitoil+ACP, o qual é depois hidrolisado a palmitato. A formação e clivagem do ácido cítrico, à custa de ATP, estão implicadas no transporte de grupos acetilo através da membrana interna mitocondrial para o citoplasma (Figura 11). Estes também podem ser transportados quando ligados à carnitina, pela acção da carnitina acetil-CoA. O NADPH necessário para a síntese é assegurado pela transferência de equivalentes redutores mitocondriais pelo ciclo piruvato-malato e pela via da

pentose fosfato. Os processos de alongamento insaturação, como já foi referido, são efectuados por sistemas enzimáticos da membrana do reticulo endoplasmático. A insaturação requer NADH e  $O_2$  e é assistida por um complexo que consiste numa flavoproteína, um citocromo e uma proteína com ferro mas sem grupo hemo (Berg *et al.*, 2002).

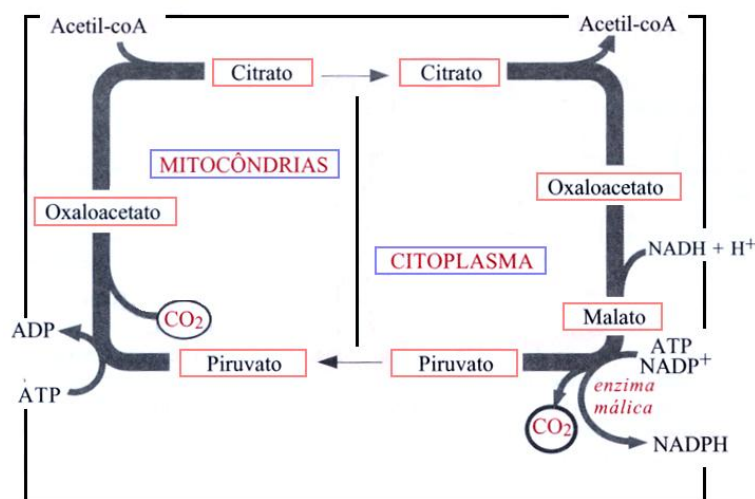


Fig. 10 – Mecanismo de síntese de ácidos gordos enfatizando a transferência de acetil-CoA das mitocôndrias para o citoplasma, com produção de NADPH (Campos, 1998).

As insaturases, são oxidases que actuam sobre resíduos acil-CoA, utilizando  $NAD^+$  ou  $NADPH$ , citocromo P450 e dioxigénio. Os animais omnívoros possuem insaturases que actuam nas posições 5, 6 e 9, o que significa que é impossível introduzir ligações entre o átomo de carbono 9 e o átomo de carbono  $\alpha$ . Os carnívoros têm insaturases 5 e 6 mas não têm insaturase 9 e, por isso, insaturam apenas entre o carbono 9 e o carbono 1.

Os monoinsaturados formam-se pela acção duma  $\Delta 9$  insaturase sobre o resíduo acilo saturado correspondente, palmitoil-CoA para o ácido palmitoleico e estearil-CoA para o ácido oleico. O acil-CoA combina-se com a insaturase, que exercerá no complexo acilo-enzima uma acção hidroxilase seguida de uma acção desidratase com formação dos complexos hidroxiaçil-enzima e acilo insaturado-enzima. Este acilo insaturado dissocia-se do enzima para originar o ácido gordo insaturado e o enzima regenerado (Halpern, 1997; Berg *et al.*, 2002).

Nos mamíferos, os ácidos linoléico ( $18:2\omega 6$ ) e linolénico ( $C18:3\omega 6$ ) não podem ser sintetizados e, por isso, são considerados ácidos gordos essenciais (Figura 12). Todavia, o ácido linoléico alimentar pode transformar-se no linolénico por uma  $\Delta 6$  insaturase e, em seguida, noutros ácidos gordos. Este enzima tem o papel limitante do sistema sendo activada pelas proteínas e hormona insulina e inibida pelos glícidos, adrenalina, glucagina e por uma situação de jejum (Halpern, 1997; Berg *et al.*, 2002).

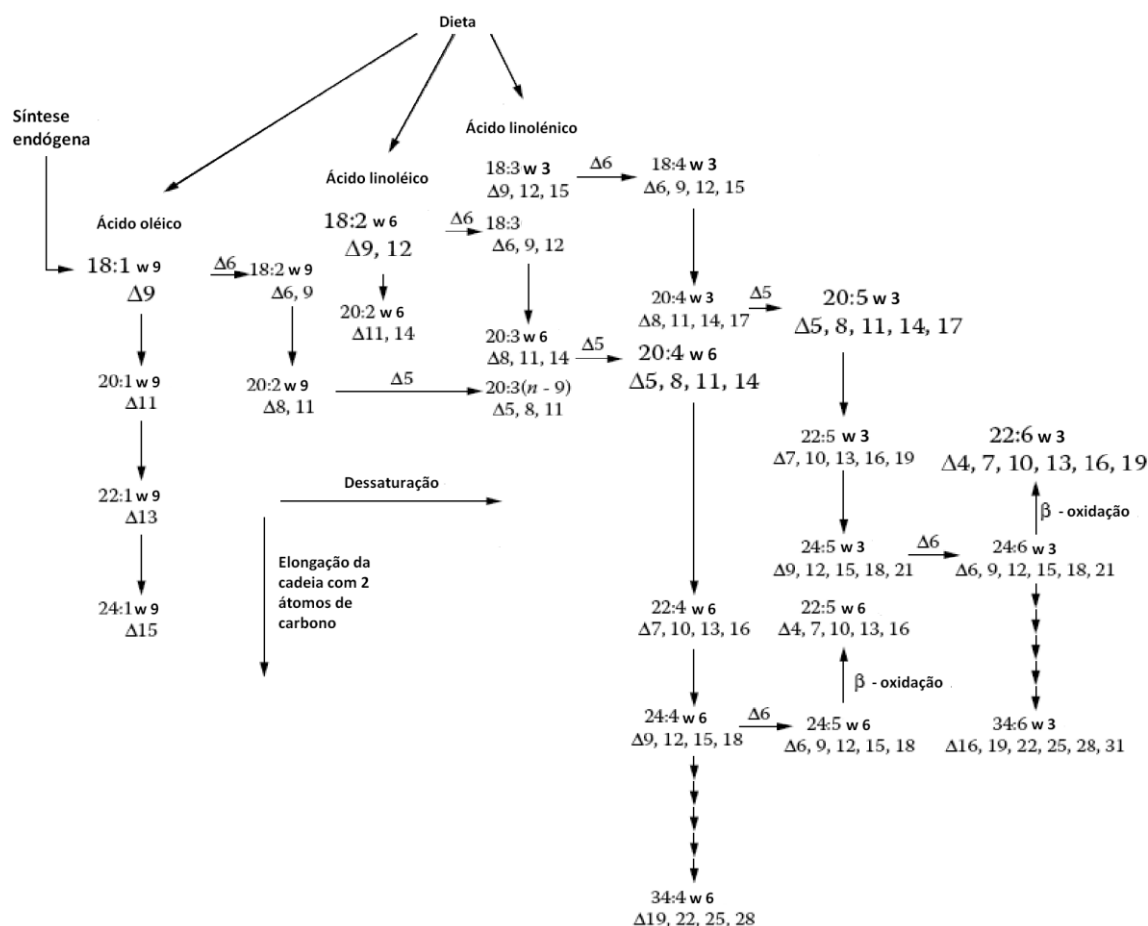


Fig. 11 – Representação da maioria das Vias de síntese de ácidos gordos poliinsaturados nos animais. Na vertical estão representadas as insaturações e na horizontal os alongamentos da cadeia. O tamanho das letras representa, na maioria dos casos, a acumulação nos tecidos (adaptado de (Harwood, 2007).

### 2.5.3.3. Função energética e estrutural dos ácidos gordos

Nos peixes, a função mais importante dos lípidos é de armazenamento e fonte de energia metabólica sob a forma de ATP através da  $\beta$ -oxidação. A composição em ácidos gordos de peixes é então influenciada pelo metabolismo próprio do organismo, pelo *status* reprodutivo (Sargent, 1989, 1995) e dieta (Kirsch *et al.*, 1969). Para algumas espécies, o aumento do tamanho corporal e o perfil em ácidos gordos varia com a dieta, mesmo dentro de grupos de espécies com a mesma faixa etária (Iverson *et al.*, 2004).

De um modo geral, ácidos gordos de cadeia curta e média provenientes da dieta não são esterificados mas são rapidamente oxidados como fonte de energia funcional nos tecidos. Os ácidos de cadeia longa são preferencialmente esterificados em triacilgliceróis e lípidos estruturais dos tecidos. Apesar de os lípidos apresentarem um estado de fluxo dinâmico, os lípidos de membrana mantêm-se estáveis em termos de composição nos tecidos, com exceção para situações de stress extremo (Tocher, 2003).

Estudos com espécies de peixe em cativeiro, mostram que os ácidos gordos C16:0, C18:1 $\omega$ 9, C20:1 $\omega$ 9 e C21:1 $\omega$ 11 são rapidamente catabolizados para produção de energia durante o crescimento e formação dos ovos (Henderson *et al.*, 1984a; Henderson *et al.*, 1984b; Henderson *et al.*, 1989). Os ácidos gordos monoinsaturados de tecidos de peixe do Antártico são preferencialmente oxidados para produção de energia comparativamente com os ácidos gordos saturados de cadeia longa. Ambos os ácidos gordos C20:5 $\omega$ 3 e C22:6 $\omega$ 3, são utilizados como fonte de energia nos tecidos dos peixe (Tocher, 2003). No entanto, o C20:5 $\omega$ 3 pode ser rapidamente  $\beta$ -oxidado enquanto o C22:6 $\omega$ 3 requer oxidação peroxissomal e mitocondrial (Tocher, 2003).

Estudos em óleos de peixe com fins dietéticos foram essenciais para o conhecimento da composição de ácidos gordos de inúmeras espécies de peixe. De um modo geral, estes estudos revelaram uma grande proporção de ácidos gordos poliinsaturados, caracterizados por elevados níveis e enorme variedade em ácidos gordos altamente insaturados  $\omega$ 3, predominantemente C20:5 $\omega$ 3 e C22:6 $\omega$ 3, cujo precursor metabólico é o C18:3 $\omega$ 3 e, em ácidos gordos altamente insaturados  $\omega$ 6, incluindo o C20:4 $\omega$ 6, cujo precursor metabólico é o C18:2 $\omega$ 6. Os ácidos gordos cujas cadeias são constituídas por número de carbonos igual ou superior a 20 e com três insaturações são denominados ácidos gordos altamente insaturados (Tocher, 2003).

Os ácidos gordos saturados predominantes na composição lipídica dos tecidos de peixe são o C16:0 e o C18:0, apesar de se encontrar uma vasta gama de ácidos gordos cujas cadeias podem ser constituída desde 12 até 24 átomos de carbono. Os ácidos gordos monoinsaturados que existem na composição lipídica de peixe podem apresentar desde 14 até 24 carbonos sendo os predominantes o C18:1 $\omega$ 9 e o C16:1 $\omega$ 7 (Tocher, 2003).

O elevado teor de ácidos gordos altamente poliinsaturados encontrados em peixe está relacionado com o facto de estes serem poiquilotérmicos, isto é, com ausência de um mecanismo interno de regulação de temperatura corporal, ou seja, esta é ajustada em função da temperatura ambiental. Em presença de vários cenários de temperatura, os peixes podem efectivamente explorar uma grande diversidade química de perfis em ácidos gordos, especificamente poliinsaturados, na composição das suas membranas de forma a defenderem as propriedades físicas das mesmas, como a fluidez e darem uma resposta adaptativa ao meio onde se encontram (Henderson *et al.*, 1987; Cossins *et al.*, 1989; Henderson, 1996). Em relação à temperatura ambiental, espécies aquáticas de água fria apresentam um maior teor em ácidos gordos altamente poliinsaturados do que espécies de regiões tropicais (Henderson *et al.*, 1987). Os óleos dos peixes do hemisfério norte apresentam elevados níveis de C20:1 $\omega$ 9 e C22:1 $\omega$ 11 produzidos pela oxidação de C20:1 e C22:1 com uma razão C20:5 $\omega$ 3/C22:6 $\omega$ 3 na ordem entre 1,0 e 1,5, já os do hemisfério sul apresentam baixos níveis de C20:1 e C22:1, elevadas proporções de ácidos gordos

altamente insaturados  $\omega_3$  e, conseqüentemente, a razão C20:5 $\omega_3$ /C22:6 $\omega_3$  aumenta para um valor aproximado de 2. Existem poucos casos de óleos de peixes com maior proporção de C22:6 $\omega_3$  do que de C20:5 $\omega_3$ , um deles é o óleo de atum (Sawada *et al.*, 1993) no qual esta proporção se explica por factores inerentes à espécie (deposição selectiva de C22:6 $\omega_3$  nos tecidos ou metabolismo selectivo de C20:5 $\omega_3$ ) e não pela influência da dieta. Foram descritos casos de catabolismo selectivo em peixes do Antártico, nos quais, havia  $\beta$ -oxidação selectiva dos ácidos gordos monoinsaturados, e em menor extensão ácidos gordos saturados, em detrimento dos ácidos gordos poliinsaturados (Sidell *et al.*, 1995). McKenzie (1998) correlacionou os níveis dos ácidos gordos C18, incluindo C18:1 $\omega_9$  e C18:2 $\omega_6$ , no músculo com a velocidade natatória do salmão, revelando a preferência no catabolismo destes ácidos gordos como combustível muscular face aos ácidos gordos poliinsaturados (McKenzie *et al.*, 1998).

Os ácidos gordos de cadeia muito curta, como o C6:0, C8:0, C10:0 e C12:0, são utilizados como fonte rápida de energia e, conseqüentemente, apresentam uma baixa taxa de deposição em tecidos de peixe não afectando significativamente a composição em ácidos gordos dos mesmos. Estudos realizados em perca do mar (*Archosargus rhomboidalis* L., 1758), revelaram que a taxa de deposição de ácidos gordos de cadeia curta oscilava entre 1 e 3%. Em larvas de carpa (*Cyprinus carpio* L., 1758) houve deposição significativa de C8:0 e C10:0 em lípidos neutros, com o C8:0 a sofrer alongamento para C10:0, e completa ausência de deposição na fracção polar (Tocher, 2003). Estudos em salmão do Atlântico (*Salmo salar* L., 1958) revelaram que estes dois ácidos gordos são facilmente digeríveis e totalmente absorvidos no intestino. Fontagne *et al.* (2000a) demonstrou, em larvas de carpa, que os ácidos gordos C6:0 e C8:0 possuem um papel importante na estimulação do crescimento. Existem evidências que os ácidos gordos de cadeia curta, para além de utilizados como fonte de energia alternativa, também podem desempenhar um papel benéfico na regulação lipídica corporal (Fontagne *et al.*, 2000). Todavia, trabalhos realizados em salmão do Atlântico em regime de cativeiro e sujeitos a uma dieta acima de 2% do total em ácidos gordos de cadeia curta, revelaram que estes não afectavam o crescimento, a mortalidade, os níveis lipídicos ou a composição em ácidos gordos dos tecidos (Bjerkeng *et al.*, 1999).

As membranas celulares necessitam de ácidos gordos insaturados para manutenção da sua estrutura funções e integridade (Hajri *et al.*, 2002). Os ácidos gordos poliinsaturados são os principais constituintes dos fosfolípidos, onde parecem conferir propriedades distintas nas membranas, em particular reduzindo a sua rigidez. A presença de ácidos saturados e monoinsaturados asseguram um correcto equilíbrio entre rigidez e flexibilidade. As membranas dos peixes apresentam elevadas quantidades de ácidos gordos altamente insaturados da família  $\omega_3$  para a manutenção da estrutura, função das membranas e prevenção contra possíveis danos oxidativos (Sargent, 1995).



No coração, os ácidos gordos e seus compostos derivados também se apresentam como fonte de energia e exercem um papel crucial nos componentes estruturais das membranas celulares dos cardiomiócitos (De Windt *et al.*, 2001). As membranas celulares limitam células e organelos celulares e funcionam como barreiras semi-permeáveis essenciais para separar os ambientes intracelular e intra organelar e, conseqüentemente regulam a homeostase celular. Os principais componentes das membranas celulares são os fosfolípidos. Os cardiomiócitos estão equipados com inúmeras enzimas que catalisam a hidrólise e a síntese de componentes membranares (Van der Vusse *et al.*, 1992). A regulação da renovação da membrana permite que os cardiomiócitos respondam a variações no ambiente extra celular alterando propriedades físico-químicas das suas membranas (De Windt *et al.*, 2001). Em condições normais de oxigenação os processos de síntese estão em equilíbrio com os processos hidrolíticos, logo a quantidade de resíduos acilo não esterificados é baixa (De Windt *et al.*, 2001).

No músculo cardíaco, os ácidos gordos de cadeia longa altamente insaturados, resultantes do catabolismo dos triacilgliceróis, são importantes substratos energéticos. Os ácidos gordos constituintes dos fosfolípidos desempenham um papel importante na constituição e funcionalidade das membranas celulares (De Windt *et al.*, 2001).

Além da manutenção das membranas, os ácidos gordos poliinsaturados presentes nos fosfolípidos são também precursores biossintéticos de eicosanóides, incluindo prostaciclina, lipoxigenases, tromboxanos, leucotrienos e lipoxinas. Estes compostos são sintetizados pela acção dos enzimas ciclooxigenases, cuja nomenclatura correcta é prostaglandina endoperoxídeo sintase e de lipoxigenases. Os eicosanóides derivam de ácidos gordos poliinsaturados C20, como o C20:4 $\omega$ 6, o C20:3 $\omega$ 6 e C20:5 $\omega$ 3, quando estes são libertados da posição sn-2 de fosfolípidos teciduais pela acção de fosfolipase A2 (Six *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2001). Apesar de ambos os ácidos C20:4 $\omega$ 6 e C20:5 $\omega$ 3 serem precursores de eicosanóides em tecidos de peixe, o primeiro é o substrato preferencial, apesar do ácido gordo C20:5 $\omega$ 3 ser o preponderante nos fosfolípidos dos tecidos. Nos peixes, os ácidos gordos C20:5 $\omega$ 3 e C20:3 $\omega$ 6 competem pela produção de eicosanóides com os ácidos gordos C20:4 $\omega$ 6 e C20:4 $\omega$ 3, este último resultante do alongamento do C18:4 $\omega$ 3. A produção de eicosanóides é influenciada pela razão C20:4 $\omega$ 6/C20:5 $\omega$ 3 e uma alteração neste equilíbrio pode causar danos na estrutura e função dos tecidos. Os eicosanóides são reguladores do sistema autócrino, isto é, são compostos de curta duração que actuam nas células vizinhas das células de origem. Virtualmente, todos os tecidos produzem eicosanóides e apresentam diversas funções fisiológicas tais como no sistema coagulação do sangue, no sistema neuronal, cardiovascular (acção sobre o tónus), reprodutivo, respiratório, renal, endócrino e imunitário. O equilíbrio entre a razão tromboxanos e prostaciclina influencia indirectamente a coagulação sanguínea e a homeostase, já

os tromboxanos, prostaciclina e prostaglandinas apresentam propriedades vasoativas e cardiovasculares (Calder, 2001; Tocher, 2002).

Nos peixes, os ácidos gordos para além de fonte energética no processo de crescimento desde o período de desova até à fase adulta (Tocher *et al.*, 1985a; Tocher *et al.*, 1985b), também desempenham importante papel na reprodução, como fornecedores de energia rápida quer para os progenitores quer para os futuros descendentes (Henderson *et al.*, 1984a; Henderson *et al.*, 1984b; Sargent, 1989).

## **2.6. Causas do desaparecimento da lampreia-marinha**

Na Europa, nos últimos 30 anos, as populações de lampreia-marinha sofreram uma diminuição drástica (Lelek, 1987; Renaud, 1997). Nos rios Portugueses, nas últimas décadas vários autores averiguaram uma redução na população de lampreias marinhas (Almeida *et al.*, 2000; Quintella *et al.*, 2003; Rogado *et al.*, 2005; Quintella, 2006).

Em Portugal, a lampreia-marinha é classificada como “vulnerável” no Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal (Rogado *et al.*, 2005). Um taxon diz-se vulnerável quando se considera que enfrenta um risco de extinção elevado na natureza. A tendência populacional tem sofrido um declínio continuado da área de habitat utilizável em Portugal, que se considera inferior a 100 km<sup>2</sup> (Rogado *et al.*, 2005). Relativamente ao efectivo populacional, não existem evidências do seu declínio, devendo as flutuações interanuais ser interpretadas como ciclos naturais. Doadrio (2001) refere um acentuado declínio em Espanha, com uma área de ocupação da ordem dos 2.000 km<sup>2</sup> (Doadrio, 2001). O efectivo populacional em Portugal, baseado no número de capturas de pescadores profissionais, não deve atingir os 100.000 indivíduos (Rogado *et al.*, 2005). Esta considerável diminuição do número de lampreias, em Portugal, pode estar associada a vários factores tais como a construção de barragens, sobrepesca, destruição do habitat e qualidade e disponibilidade de água. (Quintella *et al.*, 2003; ICN, 2006).

Os principais rios de Portugal e seus afluentes são habitats preferenciais da lampreia-marinha e são usados desde o início da migração reprodutora até ao momento da desova (Figura 3) (Quintella, 2006). A edificação de barragens, para produção de energia hidroeléctrica, açudes e outras barreiras construídas pelo Homem, são factores responsáveis por restringir a área disponível para esta espécie nas bacias hidrográficas Portuguesas (Quintella, 2006). As barragens bloqueiam a continuidade longitudinal do rio interrompendo as rotas migratórias dos adultos, durante a migração reprodutora, para os locais adequados à construção de ninhos, acasalamento, desova e primeiras fases de desenvolvimento larvar. Mesmo quando existem sistemas de passagem para peixes, os indivíduos têm dificuldade em transpor os obstáculos, impedindo ou comprometendo a reprodução

(ICN, 2006; Quintella, 2006). As barragens são igualmente factores que, afectam também a fase da migração trófica da lampreia, durante a qual as larvas, transportadas a favor da corrente, sofrem várias metamorfoses até se tornarem jovens adultas e entrarem no mar (Quintella *et al.*, 2003). A construção destas barreiras pode alterar o ecossistema da lampreia-marinha prejudicando o seu bem-estar e reduzindo a taxa de sobrevivência (Almeida *et al.*, 2000). A construção destas barreiras e, a existência de redes em vários pontos do rio, exige um enorme esforço físico por parte das lampreias para a sua transposição e, quando há limitação de espaço, os animais tendem a agrupar-se tornando-se alvos fáceis para os pescadores (Quintella, 2006). É sabido que estas barreiras físicas modificam a descarga da água, a temperatura da água, aumentam a erosão dos rios, alteram na quantidade e composição do material em suspensão, sendo a alteração destes factores prejudicial para a população adulta e larval da lampreia-marinha (Applegate, 1950; Hardisty *et al.*, 1971a). A lampreia-marinha é sensível a alterações na qualidade e disponibilidade da água dos rios e seus afluentes frequentemente associadas à poluição doméstica, industrial ou agrícola (Maitland, 2003; Quintella, 2006). A destruição do habitat vital para as lampreias marinhas está muito associado a actividades como dragagem comercial, canalização e projectos de irrigação são exemplos de actividades que podem destruir áreas vitais para a lampreia-marinha (Quintella, 2006).

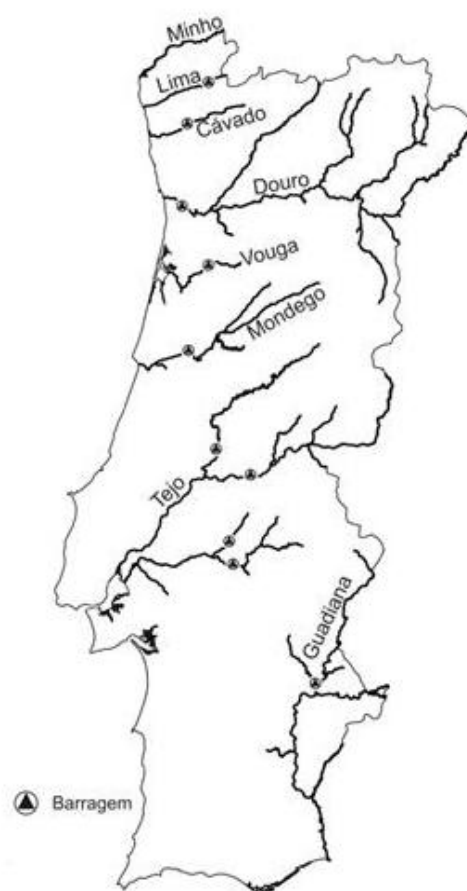


Fig. 12 – Localização dos afluentes das oito bacias hidrográficas e respectivas barragens (Quintella, 2006).

A alteração do regime de caudais a jusante, a qual depende do regime de exploração da barragem, reflectindo-se na redução do caudal, na sua homogeneização ao longo do ano ou na ocorrência de flutuações bruscas. A diminuição do caudal a jusante, com o eventual aumento da intrusão da cunha salina nos estuários, reduz o habitat dulciaquícola disponível, com a consequente perda de locais de crescimento, alimentação e desova. A conversão de um sistema lótico em lêntico, com a consequente alteração dos parâmetros físico-químicos da água e das comunidades animais e vegetais. A retenção de sedimentos a montante, agravando a erosão das margens nesta área e alterando o leito do rio a jusante, o que pode implicar a desestabilização da vegetação ribeirinha, fundamental para o desenvolvimento dos juvenis. Por outro lado, reduz os locais disponíveis para a postura (ICN, 2006).

A extracção de materiais inertes, induzindo alterações da morfologia do leito do rio (alargamento e consequente diminuição da profundidade e velocidade da corrente) e a destruição da vegetação ripícola, tornam as zonas intervencionadas impróprias para locais de abrigo, alimentação e desova, sendo particularmente grave se efectuada nas zonas e épocas de desova da espécie. Durante os trabalhos de extracção há ainda um elevado aumento da turbidez da água num troço considerável a jusante, o que pode provocar a asfixia dos peixes (devido à deposição de partículas nas guelras) e a colmatção das posturas, podendo causar mortalidade em todas as fases do desenvolvimento da espécie (ICN, 2006).

A lampreia-marinha, no rio Minho, pode usar como habitats os afluentes Mouro, Gadenha e Coura, sendo o seu percurso de migração limitado pela barragem de Frieria, que dista 80 km da foz (P.R. Almeida, com. press.). No rio Lima, os afluentes utilizados são o Estorões e Vez e a barragem que impede o seu percurso é Touvedo situada a 48 km da foz (Santos *et al.*, 2002). No rio Cávado e Douro, as barragens de Penide (27 km da foz) e Crestuma-Lever (12 km da foz), respectivamente, não permitem a continuação longitudinal da migração. Os locais possivelmente utilizados como percurso migratório pela lampreia-marinha no rio Vouga são os afluentes Caima e Águeda e no Mondego são os afluentes Ceira e Alva (Almeida, Quintella and Dias, 2002). Como barreiras geográficas dos rios Vouga e Mondego são, respectivamente, Grela (Andrade *et al.*, 2007) e Açude-Ponte (Almeida *et al.*, 2000; Almeida, Quintella and Dias, 2002; Almeida, Silva *et al.*, 2002; Quintella *et al.*, 2003). A barragem Belver, a 170 km da foz, limita o percurso da lampreia no rio Tejo, no entanto, o afluente Sorraia permite a continuação do percurso de migração já o afluente Zêzere apresenta uma barragem que não permite passagem da lampreia-marinha, a barragem de Castelo de Bode (Assis, 1990). Por fim, no rio Guadiana, a percurso migratório da lampreia-marinha é limitado naturalmente pelo “Pulo do Lobo”, cuja queda de água em anos de baixa pluviosidade constitui uma barreira intransponível para os migradores anádromos. Nos anos em que os animais conseguem ultrapassar

este obstáculo, o seu o percurso migratório é limitado pela barragem de Pedrógão (P.R. Almeida, com. Press.).

A poluição resultante de descargas de efluentes não tratados de origem industrial ou urbana, a par com fontes de poluição difusa devidas à intensificação da utilização de pesticidas e fertilizantes na agricultura, cria situações de elevada eutrofização do meio, com a consequente perda da qualidade da água, podendo levar a situações de elevada toxicidade, com maior repercussão nos períodos de estiagem (ICN, 2006).

A sobrepesca é uma das principais ameaças à conservação da lampreia-marinha em Portugal devido à sua importância gastronómica e consequente elevado valor comercial. A utilização de meios de captura ilegais é outro factor também responsável pela diminuição de efectivos populacionais (ICN, 2006). A regulamentação da pesca profissional define a temporada de pesca entre os dias 15 de Janeiro e 15 de Junho (Anónimo, 1970) (Quintella, 2006).

A sobre-exploração dos recursos hídricos - nomeadamente através de captações de água ou da implementação de transvases - provoca a diminuição dos caudais, reduzindo drasticamente o habitat disponível, nomeadamente para a realização de posturas. Para além disso, a diminuição dos caudais aumenta a concentração das substâncias poluentes e altera profundamente as características do habitat (velocidade da corrente, temperatura, oxigenação, concentração de diversas substâncias e nutrientes, etc.) adequadas à espécie. O caudal na foz desempenha ainda um papel importante na estimulação dos reprodutores para iniciarem a migração reprodutora, uma vez que apenas entram nos rios mais caudalosos. Assim, a diminuição do caudal pode fazer diminuir drasticamente a taxa de entrada dos animais nos estuários, comprometendo a realização da sua migração reprodutora (ICN, 2006).

A regularização dos sistemas hídricos - nomeadamente através da transformação dos cursos de água em valas artificiais com a uniformização do substrato, no intuito de melhorar o escoamento hídrico – leva à modificação drástica do leito do rio, à destruição total da mata ripícola e da vegetação aquática e à reestruturação artificial das margens, provocando a homogeneização do habitat, eliminando a alternância das zonas de remanso e de rápidos, essenciais para o refúgio, descanso, reprodução ou alimentação dos peixes (ICN, 2006).

A destruição da vegetação ripícola - nomeadamente associada a acções de limpeza das margens e leito dos cursos de água, extracção de inertes e aumento das áreas agricultadas - diminui o grau de ensombramento dos cursos de água, com consequências ao nível da temperatura e oxigenação da água. Provoca ainda a redução dos locais de abrigo e alimentação dos peixes. Por outro lado, a destruição da vegetação das encostas marginais (área de drenagem) altera o regime de

infiltração da água e, consequentemente, o regime dos caudais, aumentando a frequência e intensidade de cheias e secas, a erosão das margens e o depósito de sedimentos, com consequências negativas a nível da alimentação, abrigo e reprodução desta espécie (ICN, 2006).

### **2.6.1. Legislação nacional e internacional de Protecção da Lampreia-marinha**

#### **Legislação Internacional:**

Listada no Anexo II da Directiva n.º 92/43/CEE (EUR-Lex), do Conselho, de 21 de Maio, “Relativa à preservação dos habitats naturais e da fauna e da flora selvagens (Directiva Habitats) ” e no Appendix III da Convenção relativa à protecção da vida selvagem e dos habitats naturais (Convenção de Berna) (Lelek, 1987; Renaud, 1997).

#### **Legislação Nacional (Diário da República Electrónico – www.dre.pt):**

A) Lei nº 2097, de 6 de Junho de 1959, publicada no Diário do Governo - 1.ª Série, Nº 129, de 06.06.1959, pág. 660, que “Promulga as bases do fomento piscícola nas águas interiores do país”;

regulamentada

a1) pelo Decreto nº 44623, de 10 de Outubro de 1962, publicado no Diário do Governo - 1.ª Série, Nº 233, de 10.10.1962, pág. 1336, que “Aprova o regulamento da Lei 2097, de 6 de Junho de 1959, que promulga as bases do fomento piscícola nas águas interiores do País”;

a2) pelo Decreto nº 312/70, de 6 de Junho de 1970, publicado no Diário do Governo - 1.ª Série, Nº 155, de 06.07.1970, pág. 861, que “Dá nova redacção a várias disposições do Decreto n.º 44623, que aprova o regulamento da Lei n.º 2097, que promulga as bases do fomento piscícola nas águas interiores do País”;

B) Decreto Regulamentar nº 43/87, de 17 de Julho, publicado no Diário da República - 1.ª Série, Nº 162, de 17.07.1987, pág. 2814, que “Define, nos termos do artigo 14.º do Regulamento (CEE) n.º 3094/86 (EUR-Lex), as medidas nacionais de conservação dos recursos biológicos aplicáveis ao exercício da pesca em águas, quer oceânicas, quer interiores, sob soberania e jurisdição portuguesas”;

rectificado

b1) pela Declaração de Rectificação n.º 199/87, publicada no Diário da República - 1.ª Série, Nº 199-Supl, de 31.08.1987, pág. 3360-(9);

e alterado

b2) pelo Decreto Regulamentar n.º 3/89, de 18 de Janeiro, publicado no Diário da República - 1.ª Série, Nº 24, de 18.01.1989, que “Altera o Decreto Regulamentar numero 43/87, de 17 de Julho, referente a tipologia das artes de pesca, áreas de pesca, características das embarcações e tratamento de espécies”;

b3) pelo Decreto Regulamentar n.º 28/90, de 11 de Setembro, publicado no Diário da República - 1.ª Série, Nº [210], de 11.09.1990, pág. 3684, que “Altera o Decreto Regulamentar numero 43/87, de 17 de Julho (Define as medidas nacionais de conservação dos recursos biológicos aplicáveis ao exercício da pesca em águas, quer oceânicas, quer interiores, sob soberania e jurisdição portuguesa)”;

b4) pelo Decreto Regulamentar n.º 30/91, de 4 de Junho, publicado no Diário da República - 1.ª Série B, Nº [127], de 04.06.1991, pág. 3009, que “Altera o artigo 84 do Decreto Regulamentar número 43/87 de 17 de Julho (define as medidas nacionais de conservação dos recursos biológicos aplicáveis ao exercício da pesca em águas portuguesas) prorrogando o prazo nele estabelecido ate 31 de Dezembro de 1992, a fim de se proceder as modificações necessárias exigidas para as embarcações de pesca”;

b5) pelo Decreto-Lei n.º 383/98, de 27 de Novembro, publicado no Diário da República - 1.ª Série A, Nº 275, de 27.11.1998, pág. 6583, que “Altera o Decreto-lei 278/87, de 7 de Julho, que fixa o quadro legal do exercício da pesca e das culturas marinhas em águas sob soberania e jurisdição portuguesas”;

b6) pelo Decreto Regulamentar nº 7/2000, de 30 de Maio, publicado no Diário da República - 1.ª Série B, Nº 125, de 30.05.2000, pág. 2509, que “Altera o Decreto Regulamentar n.º 43/87, de 17 de Julho, estabelecendo as medidas nacionais dos recursos vivos aplicáveis ao exercício da pesca em águas sob soberania e jurisdição nacional”;

b7) pelo Decreto Regulamentar nº 15/2007, de 28 de Março, publicado no Diário da República - 1.ª Série, Nº 62, de 28.03.2007, pág. 1783, que “Altera o Decreto Regulamentar n.º 43/87, de 17 de Julho (Define as medidas nacionais de conservação dos recursos biológicos aplicáveis ao exercício da pesca) eliminando a autorização prévia para o exercício da actividade da pesca e o livrete de actividade”.

C) Decreto-Lei nº 316/89, de 22 de Setembro, publicado no Diário da República – 1.ª Série, n.º 219/89, de 22.09.1989, pag. 4224, que “Regulamenta a aplicação da Convenção relativa à protecção da vida selvagem e dos habitats naturais (Convenção de Berna)”, Appendix III;

alterado

c1) pelo Decreto-Lei n.º 196/90, de 18 de Junho, publicado no Diário da República – 1.ª Série, n.º 138/90, de 18.06.1990, pag. 2560, “Altera o Decreto-Lei n.º 316/89, de 22 de Setembro (regulamenta a Convenção Relativa a Conservação da Vida Selvagem e dos Habitats Naturais da Europa)”;

D) Decreto-Lei n.º 140/99, de 14 de Abril, publicado no Diário da República – 1.ª Série, n.º 96/99, de 14.04.1999, pag. 2183, que “Revê a transposição para a ordem jurídica interna da Directiva n.º 79/409/CEE, do Conselho, de 2 de Abril (relativa à conservação das aves selvagens), e da Directiva n.º 92/43/CEE, do Conselho, de 21 de Maio (relativa à preservação dos habitats naturais e da fauna e da flora selvagens). Revoga os Decretos-lei n.ºs 75/91, de 14 de Fevereiro, 224/93, de 18 de Junho, e 226/97, de 27 de Agosto”, Appendix B-II;

alterado e republicado

d1) pelo Decreto-Lei n.º 49/2005, de 24 de Fevereiro, publicado no Diário da República – 1.ª Série-A, n.º 39, de 24.02.2005, pag. 1670, “Primeira alteração ao Decreto-Lei n.º 140/99, de 24 de Abril, que procedeu à transposição para a ordem jurídica interna da Directiva n.º 79/409/CEE (EUR-Lex), do Conselho, de 2 de Abril, relativa à conservação das aves selvagens (directiva aves) e da Directiva n.º 92/43/CEE (EUR-Lex), do Conselho, de 21 de Maio, relativa à preservação dos habitats naturais e da fauna e da flora selvagens (directiva habitats).”

E) Resolução do Conselho de Ministros n.º 115-A/2008, de 21 de Julho, publicada no Diário da República - 1.ª Série, Nº 139-Supl, de 21.07.2008, pág. 4536-(2), que “Aprova o Plano Sectorial da Rede Natura 2000 (PSRN2000) relativo ao território continental, publicado em anexo, composto por relatório constante do anexo I, fichas de sítios e zonas de protecção especial (ZPE), constante do anexo II, e glossário e orientações de gestão, constante do anexo III. Cria a Comissão de Acompanhamento e Avaliação do PSRN2000, cuja composição e competências constam do nº 8 do relatório, constante do anexo I.”

F) Portaria n.º 144/2009, de 5 de Fevereiro, publicada no Diário da República - 1.ª Série, Nº 25, de 05.02.2009, pág. 834, que “Define as áreas e condicionalismos ao exercício da pesca lúdica, incluindo a apanha lúdica, em águas oceânicas da subárea da zona económica exclusiva do continente, águas interiores marítimas e águas interiores não marítimas sob jurisdição da autonomia marítima.”

alterada

f1) pela Portaria n.º 458-A/2009, de 4 de Maio, publicada no Diário da República - 1.ª Série, Nº 85-Supl, de 04.05.2009, pág. 2524-(2), que “Procede à primeira alteração da Portaria n.º



143/2009, de 5 de Fevereiro, que define os condicionalismos específicos ao exercício da pesca lúdica no Parque Natural do Sudoeste Alentejano e Costa Vicentina (PNSACV), e da Portaria n.º 144/2009, de 5 de Fevereiro, que define as áreas e condicionalismos ao exercício da pesca lúdica, incluindo a apanha lúdica, em águas oceânicas da subárea da zona económica exclusiva do continente, águas interiores marítimas e águas interiores não marítimas sob jurisdição da autonomia marítima.”

### 3. Metodologia

#### 3.1. Estratégia

Local de realização	A captura dos animais efectuou-se nas bacias hidrográficas Minho, Lima, Cávado, Douro, Vouga, Mondego, Tejo e Guadiana. O trabalho laboratorial iniciou-se no Centro de Oceanografia, em Lisboa, foi continuado no Laboratório de Bioquímica Analítica Fase III, CLAV, em Évora, e nos laboratórios do Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrâneas, no pólo da Mitra da Universidade de Évora.
Tempo de realização	2,5 Anos (Início: Março de 2008; Fim: Outubro de 2010)
Modelo biológico	Lampreia-marinha ( <i>Petromyzon marinus</i> L.)
Dimensão da amostra	20 Indivíduos por bacia x 8 bacias
Amostragem	Indivíduos capturados no início da migração reprodutora nas bacias hidrográficas portuguesas: Minho, Lima, Cávado, Douro, Vouga, Mondego, Tejo e Guadiana.
Tecido	Músculo cardíaco.
Métodos laboratoriais	Dissecção de lampreia-marinha e processamento de tecidos e órgãos;  Extracção de lípidos totais do músculo cardíaco pelo método ASE;  Transesterificação dos lípidos totais pelo método de Morrison and Smith (1964);  Identificação do perfil em ácidos gordos por cromatografia de partição gás-líquido.
Tratamento de resultados	Comparação do perfil de ácidos gordos do músculo cardíaco de lampreia-marinha em diferentes bacias hidrográficas portuguesas através dos métodos: análise de variância multivariada (MANOVA) e análise discriminante múltipla (MDA) através do programa estatístico SPSS 17.

### 3.2. Organigrama

A seguir será apresentado um diagrama que permite a simplificação e racionalização através da representação esquemática dos processos que permitiram a caracterização do perfil em ácidos gordos nos lípidos totais do músculo cardíaco de lampreia-marinha em oito bacias portuguesas.



### 3.3. Material e métodos

#### 3.3.1. Reagentes e equipamento

Os quadros 4 e 5 sumariam os reagentes e equipamento utilizados no procedimento.

**Quadro 4 - Lista de reagentes com respectivo grau de pureza e fornecedor.**

Compostos	Fornecedor	Cidade	Grau de pureza (%)
Ar	Praxair	Maia, Portugal	99,9
Azoto (N <sub>2</sub> )	Praxair	Maia, Portugal	99,9
BHT (C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O)	Sigma-Aldrich	Steinhein, Alemanha	99,9
Cloreto de sódio (NaCl)	Merck	Darmstadt, Alemanha	99,5
Clorofórmio (CHCl <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich	Steinhein, Alemanha	99,4
Diclorometano	Merck	Darmstadt, Alemanha	99,5
Éster metílico C19:0	Sigma	Steinhein, Alemanha	98,0
Éter de petróleo	Panreac	Barcelona, Espanha	-
FAME Mix 37	Supelco	Bellefont, USA	99,0-99,9
Hélio (He)	Praxair	Maia, Portugal	99,9
Hidróxido de sódio (NaOH)	Merck	Darmstadt, Alemanha	≥99,0
Metanol (CH <sub>3</sub> OH)	Sigma-Aldrich	Steinhein, Alemanha	
Terra de Diatomáceas	Hydromatrix (P/N S23-3)	Sannyvale, Califórnia	100,0
Triflureto de boro (BF <sub>3</sub> )	Merck	Schuchardt, Alemanha	-

**Quadro 5 - Lista de equipamento e respectiva marca.**

Equipamento	Marca e modelo
ASE - Accelerated Solvent Extractor	Dionex (ASE 100)
Balança técnica	Merobloc (PB 3002)
Balança analítica	Precisa 205 AS
Balão de vidro de evaporação	Normax (100 mL, 29-32)
Bomba oxigenadora	AIRMAX (DB-30A)
Células de extracção de 34 ml	Dionex (ASE 100)
Coluna capilar	Supelco (Omegawax 320)
Cromatógrafo	Hewlett Packard (6890 GCsystem)
Placa de aquecimento	Thermolyne SyBran (17600)
Filtros celulósicos para células de extracção de 34 ml	Dionex (ASE 100, P/N 049458)
Tanque em polietileno	Rena (Aqualife 200)
Tanques de fibra de vidro	Rena (Aqualife 200)

### 3.4. Procedimento experimental

O delineamento experimental e posterior apresentação dos resultados referentes aos dois anos e meio do projecto no âmbito do qual foi desenvolvida a presente Tese estão cronologicamente divididos em quatro grandes experiências: trabalho de campo, que inclui a captura e transporte das lampreias marinhas das respectivas bacias hidrográficas até ao laboratório; trabalho laboratorial no Centro de Oceanografia, onde se efectuaram as disseções, pesagens e dados biométricos das lampreias; trabalho laboratorial no Laboratório de Bioquímica Analítica Fase III, CLAV, em Évora, e nos laboratórios do Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrâneas, no pólo da Mitra da

Universidade de Évora, onde se extraiu, identificou e quantificou os diferentes ácidos gordos do músculo cardíaco e por fim a análise estatística para tratamento dos dados obtidos.

### 3.4.1. Captura e eutanásia

Em cada bacia hidrográfica dos rios Minho, Lima, Cávado, Douro, Vouga, Mondego, Tejo e Guadiana foram capturados entre 25 a 30 animais. Os animais foram capturados por pescadores profissionais com recurso a redes de emalhar ou de estacada. Todos os indivíduos foram capturados na época de início da migração reprodutora junto à foz de cada rio, à excepção dos indivíduos do Rio Tejo e do Rio Guadiana que foram capturados um pouco mais a montante, 67 e 70 km, respectivamente.

**Quadro 6 - Coordenadas dos locais de capturas das lampreias marinhas.**

Rio	Local de captura	Coordenadas
Minho	Caminha	41° 50' 0" N, 8° 50' 0" W
Lima	Viana do Castelo	41° 42' 0" N, 8° 49' 12" W
Cávado	Fão	41° 31' 0" N, 8° 47' 0" W
Douro	Porto	41° 9' 0" N, 8° 36' 40" W
Vouga	São Jacinto (Ria de Aveiro)	40° 39' 44" N, 8° 43' 50" W
Mondego	Figueira da Foz	40° 7' 0" N, 8° 54' 0" W
Tejo	Entre Escaroupim e Salvaterra de Magos	39° 1' 33" N, 8° 47' 34" W
Guadiana	Mértola	37° 38' 0" N, 7° 40' 0" W

Os animais foram sempre transportados vivos para o laboratório num tanque em polietileno com cerca de 0.4 m<sup>3</sup> de capacidade, ao qual foi acoplada uma bomba oxigenadora (AIR MAX, modelo DB-30A), permitindo a circulação de 32 L de ar por minuto. No laboratório foram colocados em tanques de fibra de vidro com 2 m<sup>3</sup> e 4 m<sup>3</sup> de capacidade, equipados com sistemas de suporte de vida apropriados (*i.e.* filtros biológicos, refrigeradores e sistemas de oxigenação).

Na eutanásia das lampreias capturadas utilizou-se uma solução anestésica de 2-fenoxietanol em 1mL/L de água numa mala térmica, onde se colocou um indivíduo de cada vez minutos antes dos ensaios biométricos. Esta solução actua como inibidor da actividade dos fagócitos, desactiva o sistema imunológico e é depressor do sistema nervoso central do animal. A diluição utilizada na eutanásia das lampreias marinhas é segura para o investigador (Gosselin *et al.*, 1984; Velisek *et al.*, 2004; Velisek *et al.*, 2005; Caamano Tubío *et al.*, 2010).

### 3.4.2. Caracterização biométrica e recolha do tecido cardíaco

Após a morte, procedeu-se à determinação dos dados biométricos dos indivíduos: peso total (Tw, g) e comprimento total (TL, cm) - entre a extremidade bucal e da barbatana caudal - e efectuaram-se os cálculos dos factores de condição de Fulton e alométrico para todos os animais capturados.

Em peixes, o factor de condição fornece importantes informações sobre o estado fisiológico ao nível da taxa de crescimento, estado nutricional, potencial reprodutivo e de bem-estar dos espécimes e populações piscícolas num dado ambiente, a partir do pressuposto de que indivíduos com maior massa num dado comprimento estão em melhor condição (Rocha *et al.*, 2008). Conforme Royce (1972), o factor de condição é influenciado por factores intrínsecos, como os factores genéticos, imunológicos e hormonais e extrínsecos, como a profundidade, densidade e salinidade da água, o clima e a quantidade e a qualidade dos alimentos à disposição (Royce, 1972). Em peixes, normalmente calcula-se o factor de condição de Fulton que assume que a relação entre o peso e o comprimento é isométrica e considera que o declive da regressão entre o peso corporal e o comprimento é igual 3 (b), independentemente da amplitude de comprimentos (Le Cren, 1951; Rocha *et al.*, 2008):

$$K = (TW/TL^3) \times (1 \times 10^5)$$

Paralelamente ao presente estudo, foram analisadas preparações histológicas das gónadas para determinar o sexo dos indivíduos com a finalidade de avaliar a influência deste factor na composição em ácidos gordos no músculo cardíaco lampreia-marinha (Beamish *et al.*, 1979).

Após as pesagens e biometrias, procedeu-se à dissecação sendo o coração lavado com uma solução gelada de NaCl (0.9%). Após pesagem, procedeu-se ao fraccionamento do coração em fatias muito delgadas e cada porção foi envolvida em papel vegetal, seguida de folha de alumínio e finalmente guardada em sacos de plástico previamente identificados. As amostras foram seguidamente colocadas em *canisters*, mergulhadas em azoto líquido e posteriormente armazenadas em arcas frigoríficas a -80° C.

No laboratório, procedeu-se a nova pesagem de cada amostra de músculo cardíaco para posterior liofilização, durante 2 h, para retirar toda a água existente no tecido. Após liofilização, e obtenção de uma massa constante, efectuou-se a pesagem final para determinação da perda de água por amostra. A cada amostra foi adicionado BHT para evitar a oxidação dos lípidos presentes.

### **3.4.3. Análise da composição em ácidos gordos do tecido cardíaco**

#### **3.4.3.1. Extracção dos lípidos totais do tecido cardíaco**

As extracções de lípidos totais do músculo cardíaco foram realizadas utilizando o ASE equipado com células de extracção de 34 mL. Os filtros de extracção utilizados foram filtros celulósicos e o agente inerte foi Terra de Diatomáceas.

A cada uma das amostras, cujo peso variou entre 120 mg e os 180 mg, foi adicionado 10 g de agente inerte e num almofariz de porcelana procedeu-se à sua maceração. A mistura foi colocada numa célula de extracção de 34 mL, já previamente preparada com 2 filtros celulósicos, e preenchida totalmente com agente inerte sob a qual foi colocado o terceiro filtro celulósico. A extracção dos lípidos totais no ASE foi efectuada segundo as condições de programação apresentadas no Quadro 7.

O extracto de lípidos totais obtido foi recolhido num balão de vidro de evaporação, previamente pesado e etiquetado e foi evaporado num evaporador rotativo, a 50°C (para mistura de clorofórmio: metanol). Após completa evaporação, determinou-se gravimetricamente a massa de extracto correspondente ao teor de lípidos totais por amostra e calculou-se o rendimento da extracção. Em seguida, redissolveu-se o extracto seco em 3 mL clorofórmio e colocou-se em tubos de metilação previamente pesados e etiquetados. Armazenaram-se os extractos a -20°C até posterior utilização.

**Quadro 7 – Parâmetros programados no ASE para extracção de lípidos.**

Parâmetros de extracção	Condições
Temperatura	100° C
Pressão	13.8 Mpa
Mistura Solvente	Clorofórmio: metanol (60%: 40%) + BHT (100 mg/L)
Nº Ciclos Extracção Estáticos	2
Tempo de ciclo	5 min
Purga das Células	N <sub>2</sub> durante 60 seg

#### **3.4.3.2. Transesterificação dos lípidos totais**

Na realização da transesterificação dos lípidos totais, as amostras foram submetidas ao processo de saponificação e metilação, de acordo com o método Morrison & Smith (1964). Ao extracto de lípidos totais obtido adicionou-se 1 mL de solução metanólica de NaOH 0.5 M. Na *hotte*, procedeu-se à saponificação dos extractos durante 15 min numa placa de aquecimento a 70°C . Após arrefecimento adicionou-se 1 mL de BF<sub>3</sub> em metanol a 10% e deixou-se metilar durante 10 min a 70°C. Após arrefecimento, adicionou-se 6 mL de água destilada e posteriormente 2 mL de éter do petróleo e agitou-se vigorosamente. Recolheu-se o sobrenadante para um *vial* etiquetado e adicionou-se 250 µL de padrão interno. As amostras concentraram-se sob corrente de azoto. Os *viais* foram fechados hermeticamente e armazenados em congelador (-20°C), para posterior análise cromatográfica.

#### **3.4.3.3. Análise cromatográfica dos ésteres metílicos dos ácidos gordos**

Os esteres de ácidos gordos, constituintes da mistura de lípidos totais s do músculo cardíaco, foram separados num cromatógrafo Hewlett Packard, com software HPChem, equipado com injector

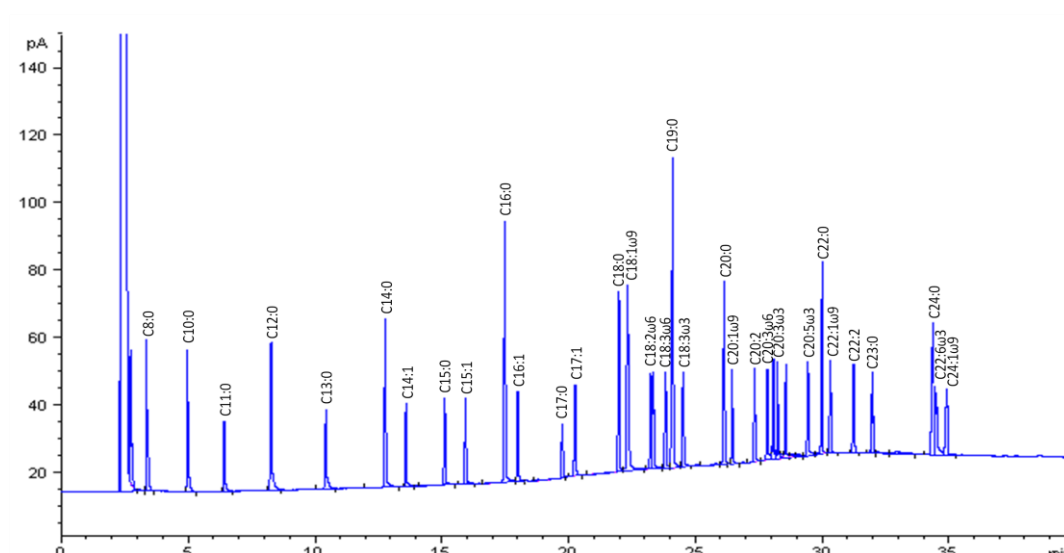
*split-splitless* e detector de ionização por chama (em inglês, FID). A coluna utilizada foi uma coluna capilar Omegawax 320 (30 m de comprimento x 0.32 mm de diâmetro interno, 0,25 µm de espessura de filme) da Supelco. A fase móvel utilizada foi o Hélio com um fluxo de 1,2 mL/min, a 200°C. As condições experimentais usadas encontram-se especificadas no Quadro 8.

O padrão interno utilizado neste estudo foi o éster metílico do C19:0 que foi adicionado a cada amostra e cromatografado nas mesmas condições experimentais. Em paralelo, foi cromatografado um padrão externo composto por ésteres metílicos já quantificados, FAME Mix 37 (10mg/mL em diclometano ao qual foi adicionado C22:5ω3), nas mesmas condições experimentais.

**Quadro 8 - Condições experimentais utilizadas na análise cromatográfica.**

Parâmetros	Condições
Temperatura do injetor	260°C
Temperatura do detector FID	270°C
Temperatura inicial do forno	140°C
Temperatura final do forno	240°C
Rampa de temperatura	4°C/min
Pressão e fluxo de Hélio	8.81 psi e 1.2 ml/min
Tempo de corrida	40 min
Razão de <i>split</i>	10

As áreas dos picos resultantes foram corrigidas pelos factores de resposta teóricos relativos do FID (Ackman, 2002). Os ésteres metílicos dos ácidos gordos foram identificados por comparação dos seus tempos de retenção com padrão externo conhecido. Para cada amostra, a composição relativa em ácidos gordos é apresentada como a percentagem de peso na composição em ácidos gordos.



**Fig. 13 – Cromatograma dos ácidos gordos do padrão FAME MIX 37 e ao padrão interno C19:0.**



#### 3.4.3.4. Análise estatística de dados

O pacote estatístico do programa SPSS versão 18.0 foi utilizado para o tratamento dos dados e análise estatística. Os dados foram transformados sempre que necessário de forma a garantir os pressupostos de normalidade, independência e homocedasticidade. Os resultados para os ácidos gordos identificados foram expressos em percentagem do total de ácidos gordos na amostra, com a finalidade de eliminar efeitos de concentração.

$$\text{Área \%} = (A_i / \Sigma A) \times 100$$

$A_i$  = área do pico individual

$\Sigma A$  = soma de todas as áreas dos picos identificados

Foi feita a ANOVA para comparar alguns dos parâmetros biométricos com os LT do coração, o peso do coração etc entre os animais das várias bacias hidrográficas em análise.

Para se testar se o perfil de ácidos gordos dos lípidos totais do coração diferia entre os animais das várias bacias e entre géneros foi realizada uma análise de modelo geral linear vulgarmente designada nos programas estatísticos por GLM, a qual permitiu a análise de variância para as variáveis dependentes (*i.e.*, ácidos gordos) mediante o uso de dois factores fixos: bacia hidrográfica e género. Deste modo, as variáveis utilizadas dividem a população em grupos e permitem testar quer a hipótese nula  $H_0$  sobre o efeito de qualquer das variáveis (bacia hidrográfica ou género,) quer a respectiva interacção, nas variáveis dependentes para os vários grupos a analisar.

Em seguida procedeu-se à análise discriminante multivariada (MDA) a fim de se conhecer qual ou quais os ácidos gordos que mais contribuíam para as diferenças no perfil de ácidos gordos do coração entre os animais das bacias hidrográficas analisadas. Este tratamento estatístico consiste numa técnica de estatística multivariada utilizada para atingir vários objectivos, tais como a identificação das variáveis que melhor diferenciam entre dois ou mais grupos de indivíduos estruturalmente diferentes e mutuamente exclusivos. Trata-se da técnica estatística mais apropriada para a separação de dois ou mais grupos definidos *à priori* (Hair *et al.*, 1998), sendo que pode vir a ser usada para determinar quais as variáveis que têm maior capacidade de predizer o grupo (Anónimo, 2003). Estas variáveis podem ainda ser utilizadas para criar um “índice” ou “função discriminante” que represente de forma parsimoniosa as diferenças entre os grupos. No presente estudo pretende-se distinguir as variáveis, neste caso os ácidos gordos dos lípidos totais, que permitem diferenciar ou separar as bacias. A partir das quinze variáveis introduzidas obtém-se uma matriz de variância e covariância totais e uma matriz conjunta da variância e covariância intra grupos. A existência de diferenças significativas entre grupos, tendo em conta todas as variáveis, pode ser determinada pela comparação destas duas matrizes através de testes multivariados de F. A análise

foi realizada segundo o método *stepwise* ascendente de combinação de variáveis que melhor separam os grupos, utilizando um valor de F de entrada ( $F=3.84$ ) e um valor de F de remoção ( $F=2.71$ ), respectivamente, para inserir ou remover uma variável. Deste modo, todas as variáveis são avaliadas, passo a passo, de forma a determinar qual a que mais contribui para a discriminação dos grupos (Anónimo, 2003), e assim maximizar a distância mínima de Mahalanobis ( $D^2$ ) (Hair *et al.*, 1998). Essa variável é então incluída no modelo se a sua adição aumentar significativamente  $D^2$ , e o processo recomeça, caso contrário a variável é removida. O valor de F para a variável revela a sua contribuição no prognóstico de pertencer a um determinado grupo e, assim sendo, indica o seu significado estatístico na discriminação entre grupos (Anónimo, 2003).

O teste lambda de Wilk ( $\lambda$ ) explica as diferenças entre os grupos, para cada função individualmente. Este valor de lambda de Wilk ( $\lambda$ ) é calculado através da divisão entre a variação não explicada e a variação total, e obtém valores que variam entre 0 e 1, sendo que os menores valores indicam grandes diferenças entre grupos e os valores elevados inexistência de diferenças.

Para testar a igualdade entre os centróides, que representam o valor médio dos resultados discriminantes de um grupo (Hair *et al.*, 1998), realizou-se uma transformação qui-quadrado do lambda de Wilk's ( $\lambda$ ). Esta transformação permite ainda verificar se todas as variáveis canónicas (resultados das funções discriminantes individuais, que representam combinações lineares das variáveis originais (Hair *et al.*, 1998)) reflectem diferenças entre populações ou apenas variação aleatória.

De modo a avaliar o sucesso da classificação das amostras, obtida através da análise discriminante efectuada, analisa-se a distribuição dos indivíduos pelos grupos a partir do gráfico das variáveis canónicas (função ortogonal). Assim, indivíduos do mesmo grupo aparecem mais próximos que indivíduos de grupos diferentes. O método de validação cruzada do tipo *leaving-one-out* permite calcular a taxa de erro de classificação (Anónimo, 1999). Por fim, para analisar o significado estatístico e testar a exactidão da classificação recorre-se ao teste Q de Press, no qual  $H_0$ : matriz de classificação idêntica ao que seria de esperar se as suas características fossem apenas devidas ao acaso (Hair *et al.*, 1998).

## **4. Resultados e Discussão**

### **4.1. Parâmetros biométricos**

Entre Março a Abril de 2008 foram capturadas 221 lampreias na foz das bacias hidrográficas dos rios Minho, Lima, Cávado, Douro, Vouga, Mondego e Tejo. No ano seguinte, nos referidos meses, foram capturadas mais 30 indivíduos no rio Guadiana, na zona de Mértola. Para análise estatística consideraram-se apenas 19 indivíduos de cada bacia escolhidos aleatoriamente.

Os parâmetros biométricos encontram-se apresentados nos Quadros 9 e 10. As lampreias menores foram capturadas no rio Vouga, com um comprimento corporal médio de 83,0 cm, um peso médio de 1077,32 g, enquanto as maiores foram as apanhadas no rio Tejo, com um comprimento corporal médio de 90,3 cm e um peso médio de 1333,68 g.

Através da ANOVA, os valores de peso total apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para os animais recolhidos nas várias bacias verificando-se que as lampreias do Tejo, Minho e Mondego registaram um peso significativamente superior aos dos animais das bacias do Vouga, Guadiana e Douro. No entanto, as bacias do Cávado e Lima apresentam valores de peso total dispersos que não assumem qualquer tendência entre os dois grupos anteriormente referidos, e como tal, não é possível considerá-los num terceiro grupo.

Relativamente ao comprimento total também foram verificadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ , ANOVA) entre os indivíduos das várias bacias,. O primeiro grupo, caracterizado pelo maior comprimento, é composto pelos animais do Minho, Tejo e Mondego, seguido do segundo grupo composto pelos indivíduos do Cávado, Lima e Guadiana e por fim o terceiro grupo formado pelas lampreias do Vouga e Douro.

De um modo geral, as lampreias marinhas em Portugal podem ser caracterizadas por um comprimento aproximado entre os 83,0 e os 94,1 cm e um peso médio entre os 1077 e os 1334 g, em concordância com os valores referidos por Hardisty (1986b) e Duarte (2003).

Nos Quadros 9 e 10 encontram-se os valores para o peso total do coração. Pode constatar-se que as lampreias da bacia do Cávado foram as que se caracterizaram por um menor peso cardíaco (2,65 g) enquanto no Tejo se registaram os maiores valores de peso (3,34 g). Novamente em relação a este parâmetro existiram diferenças significativas ( $p < 0,05$ , ANOVA) e podem destacar-se dois grupos. O primeiro grupo é composto pelos animais das bacias do Tejo, Minho e Mondego com

valores de peso de coração significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) que os do segundo grupo, formado pelas lampreias do Lima, Cávado, Douro, Vouga e Guadiana.

No quadro 12 estão representados os valores percentuais do índice entre o peso total do coração e o peso corporal eviscerado das lampreias das oito bacias hidrográficas estudadas. Para a determinação deste índice foi utilizado o peso corporal eviscerado na medida em que quer o peso do fígado quer o peso das gónadas revelaram valores muito dispares entre machos e fêmeas e dentro de cada bacia. Desta forma, os valores deste índice foram 0,29% no Vouga, 0,28% no Douro, 0,27% no Mondego e Tejo e finalmente 0,25% no Minho, Lima, Cávado. Este índice revela que as lampreias do Vouga apresentam os valores mais elevados de peso de coração relativamente ao peso corporal eviscerado, o que pode sugerir uma maior importância fisiológica do coração na sobrevivência do animal. Através da ANOVA, os valores deste índice revelaram que os animais do Minho, Tejo e Mondego se caracterizavam pelo valor significativamente maior ( $p < 0,05$ ), seguido pelo grupo dos animais do Cávado, Lima e Guadiana e finalmente o terceiro grupo formado pelas lampreias do Douro e Vouga. Trabalhos de Hardisty e Potter (1972), referem valores do índice peso do coração/peso corporal nas lampreias marinhas de 0,59% e salientam a diferença face aos índices referenciados para outros animais poiquilotérmicos (0,08 e 0,3%) e a proximidade face aos animais homeotérmicos, nomeadamente aos valores obtidos para os mamíferos (0,64%). De acordo com Hardisty e Potter (1972), este índice reflecte uma relação directa entre a dimensão do coração e respectiva taxa cardíaca e o consumo elevado de oxigénio durante a actividade muscular inerente ao ciclo de vida. Todavia, os valores determinados no presente estudo são muito próximos entre si oscilando entre 0,25 e 0,29, o que parece contrariar os índices referidos por Hardisty e Potter (1972), e mostra que este índice na lampreia-marinha é muito baixo comparativamente aos animais homeotérmicos e está próximo dos restantes animais poiquilotérmicos.

Nos peixes, a relação peso-comprimento (factor de condição) é um parâmetro muito importante e tem muitas aplicações nomeadamente, permitir a estimativa de uma destas variáveis uma vez conhecida a outra (Beyer, 1987). Esta relação tem ainda sido usada para estimar biomassas a partir de dados de frequência de comprimento e, como medida, de variação do peso esperado para o comprimento de um dado indivíduo, indicando assim a sua condição, ou seja, a acumulação de gordura visceral e o desenvolvimento das gónadas (Rossi-Wongtschowski, 1977; Araújo et al., 2001). As lampreias apresentaram uma amplitude de comprimentos variável e como tal foram determinados dois factores de condição, um assumindo um crescimento isométrico e o outro assumindo um crescimento alométrico. Le Cren (1951) afirma que os valores de  $K$  variam de 2,0 a 4,0, assumindo o valor 3,0 para um "peixe ideal", que mantém a mesma forma durante o crescimento ontogenético (Le Cren, 1951). Valores inferiores ou superiores a 3,0 indicam indivíduos

que, ao longo do crescimento, se tornam mais "longilíneos" ou "redondos", respectivamente (Le Cren, 1951). No quadro 11 estão registados os valores para o factor de condição K para os animais das bacias estudadas. Verifica-se que as lampreias da bacia do Cávado apresentam valores na ordem dos 1,8, as lampreias das bacias Minho, Lima, Vouga, Douro e Tejo na ordem dos 1,7 e os animais da bacia do Guadiana valores da ordem dos 1,6. Estes valores não revelaram, contudo, diferenças consideradas significativas do ponto de vista estatístico ( $p < 0,05$ , ANOVA). Em relação ao factor de condição alométrico, verifica-se que a função que caracteriza a relação peso-comprimento assume um comportamento potencial. A Figura 14 ilustra graficamente a relação entre o peso corporal e o comprimento das lampreias para a bacia hidrográfica do Lima e no Quadro 13, estão resumidos os valores b e o tipo de crescimento verificado para cada bacia. A bacia do Guadiana apresenta valores de b próximo de 3 assumindo um crescimento isométrico. As restantes bacias apresentam valores de declive que caracterizam um crescimento alométrico, o que significa que os indivíduos ao longo do seu crescimento apresentam fases em que são mais longilíneos ou mais "arredondados", o que reflecte a sua menor ou maior disponibilidade em termos de gordura visceral. Da análise do Quadro 11 pode verificar-se que os factores de condição alométricos nos animais do Minho, Cávado e Vouga apresentaram valores próximos oscilando entre 1,69 e 1,79; as lampreias do Lima, Mondego e Guadiana valores entre os 1,42 e 1,54 e por fim, os animais do Tejo com valor de 1,10.

Do ponto de vista estatístico, os valores do factor de condição de Fulton obtidos para os animais das oito bacias hidrográficas não registaram diferenças significativas (através da ANOVA  $p > 0,05$ ) indicando que todos os indivíduos apresentaram a mesma relação entre peso e comprimento independentemente da localização geográfica. Estes resultados sugerem que, apesar de as amostras serem originárias de diferentes localizações geográficas e apresentarem características morfométricas heterogéneas dentro da cada bacia, os níveis de gordura visceral, ou seja, reserva energética, são semelhantes e que todos os indivíduos se encontravam nas mesmas condições nutricionais.

No Quadro 12, podemos verificar que a perda de água do músculo cardíaco nas lampreias marinhas das oito bacias hidrográficas durante o processo de liofilização variou pouco entre 71,4 e 76,5%. Neste mesmo quadro, verificou-se que o rendimento de extracção de lípidos totais do músculo cardíaco variou entre os 6 e os 7,5%, sendo que o rendimento máximo foi obtido nos animais do Guadiana (7,59%) e o mínimo nos animais do Cávado (6,07%). O valor percentual do conteúdo em lípidos totais, expresso em g por g de músculo cardíaco foi superior nos animais das bacias do Douro, Mondego e Guadiana (46%), seguido pelos animais do Minho, (30%), Vouga, (27%) e por fim Lima e Tejo (23%).

Em relação ao conteúdo em lípidos totais do coração verificou-se que os animais das várias bacias registaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) podendo afirmar-se que o coração dos animais das bacias Guadiana, Mondego e Douro se caracterizou pela presença de maior teor de lípidos totais face ao coração dos animais das bacias do Tejo, Vouga, Minho, Cávado e Lima. Quando se procurou verificar se o peso total em lípidos do coração estava correlacionado com o peso total do mesmo não foi encontrada qualquer correlação significativa. Deste modo pode ser corroborada a hipótese de o conteúdo em lípidos totais no músculo cardíaco não ser influenciado por oscilações de peso corporal, e, indirectamente, pela dieta.

**Quadro 9 – Parâmetros biométricos de 19 indivíduos das bacias hidrográficas Minho, Lima, Cávado e Douro: o peso total (Pt, g), o comprimento total (Ct, cm), o peso do coração (Pt, g), índice entre o peso do coração e o peso corporal eviscerado (Pc/Pte, %) e o respectivo género.**

Minho					Lima					Cávado					Douro				
Pt	Ct	Pc	Pc/Pte	G	Pt	Ct	Pc	Pc/Pte	G	Pt	Ct	Pc	Pc/Pte	G	Pt	Ct	Pc	Pc/Pte	G
1384	94,1	3,42	0,26	M	1134	85,2	2,88	0,28	F	904	80,2	2,85	0,33	M	1150	86,9	3,16	0,29	M
1267	85,0	3,84	0,31	M	1471	90,3	3,61	0,27	F	770	88,2	2,00	0,27	M	1168	88,6	2,84	0,25	M
1423	89,5	3,22	0,25	F	1387	92,2	3,37	0,27	F	1129	88,0	2,78	0,27	F	1203	87,6	3,11	0,27	M
1319	90,9	2,88	0,23	M	1193	88,3	2,61	0,24	F	1002	85,2	2,25	0,23	F	1243	89,5	3,20	0,27	M
1311	86,1	2,94	0,25	F	1504	90,5	3,29	0,23	M	831	80,1	3,28	0,41	M	1525	85,0	3,16	0,23	F
1300	92,5	3,00	0,24	M	1121	84,7	2,44	0,24	F	883	80,9	1,99	0,23	M	988	82,6	2,86	0,30	M
1295	90,2	3,47	0,28	M	1112	87,3	2,55	0,24	M	1165	87,8	2,91	0,26	M	986	83,6	2,45	0,28	F
1026	78,9	3,01	0,30	M	1447	97,2	3,35	0,24	M	1512	93,3	3,27	0,22	M	1144	83,9	2,90	0,26	M
1806	95,0	4,76	0,27	M	1047	83,0	2,48	0,25	M	1448	88,2	3,43	0,26	F	1069	83,0	2,80	0,29	F
1190	80,5	2,41	0,21	M	1193	87,0	2,58	0,24	F	943	75,9	2,07	0,25	F	968	84,6	2,53	0,27	M
1523	94,5	3,54	0,24	M	1374	90,7	2,86	0,22	M	1381	91,6	2,00	0,15	M	1027	84,3	2,52	0,26	M
1335	87,7	3,02	0,25	F	987	84,3	2,44	0,26	M	1427	89,9	2,20	0,16	F	844	74,4	2,01	0,27	F
1368	90,6	3,02	0,24	F	1187	89,5	2,82	0,25	M	1627	93,4	2,27	0,15	F	1034	85,1	2,08	0,27	M
1383	90,1	3,01	0,24	F	842	80,1	2,17	0,29	F	1217	89,1	2,74	0,25	F	993	77,1	2,57	0,30	F
1167	86,9	2,52	0,24	F	1142	87,6	2,67	0,24	M	1528	90,1	2,91	0,21	F	1164	84,8	3,03	0,29	F
1275	87,6	2,51	0,22	F	1059	83,1	2,61	0,25	M	1236	86,3	2,36	0,21	F	994	84,2	3,54	0,37	M
1305	88,5	3,05	0,26	F	1100	83,8	2,42	0,25	F	1173	88,0	3,27	0,32	F	1051	83,7	2,96	0,29	M
1537	91,6	3,59	0,26	F	789	73,8	1,74	0,26	F	1063	84,3	2,30	0,22	M	1424	89,9	3,19	0,25	F
1106	84,2	2,51	0,25	F	1025	83,0	2,88	0,29	M	1497	96,7	3,43	0,24	M	1136	85,4	2,64	0,26	F
Média ± DP				M/F	Média ± DP				M/F	Média ± DP				M/F	Média ± DP				M/F
1332,6 ± 170	88,7 ± 4,4	3,14 ± 0,56	0,25 ± 0,03	0,90	1163,9± 199	86,4 ± 5,1	2,72 ± 0,45	0,25 ± 0,02	1,11	1196,3 ± 265	87,2 ± 5,2	2,65 ± 0,52	0,25 ± 0,06	0,90	1111,1 ± 162	84,4 ± 3,7	2,82 ± 0,39	0,28 ± 0,03	1,38

**Quadro 10 – Parâmetros biométricos de 19 indivíduos das bacias hidrográficas Vouga, Mondego, Tejo e Guadiana: o peso total (Pt, g), o comprimento total (Ct, cm), o peso do coração (Wo, g), índice entre o peso do coração e o peso corporal eviscerado (Pc/Pte, %) e o respectivo género.**

Vouga					Mondego					Tejo					Guadiana				
Pt	Ct	Pc	Pc/Pte	G	Pt	Ct	Pc	Pc/Pte	G	Pt	Ct	Pc	Pc/Pte	G	Pt	Ct	Pc	Pc/Pte	G
897	80,1	2,75	0,32	M	1209	84,0	2,92	0,25	M	1251	87,3	2,85	0,24	M	1051	80,8	2,45	0,27	F
886	81,9	1,94	0,25	F	1280	82,9	2,91	0,26	F	1455	93,4	4,37	0,33	F	1088	85,9	2,74	0,30	F
1333	90,3	3,98	0,31	M	1051	84,7	2,74	0,27	M	1432	90,9	3,93	0,29	M	912	81,8	2,98	0,34	M
1108	84,7	3,32	0,31	M	1436	91,0	3,91	0,28	M	1322	92,9	3,07	0,24	M	1133	81,9	2,79	0,28	F
1180	88,3	3,16	0,31	F	1206	91,6	2,84	0,24	M	1348	92,2	3,09	0,26	F	1343	91,9	2,77	0,23	F
949	82,3	2,63	0,31	F	1461	93,7	3,16	0,22	M	1428	91,8	2,93	0,23	F	1212	89,7	2,64	0,23	M
1074	84,4	2,14	0,23	F	1519	94,8	3,39	0,23	M	1302	88,0	3,14	0,27	F	1107	87,8	3,16	0,3	M
1402	92,2	3,96	0,30	M	1097	82,0	2,96	0,31	F	1370	89,9	3,25	0,26	F	1469	96,7	3,48	0,25	M
956	79,4	2,06	0,25	F	1426	90,8	3,12	0,25	F	1234	84,3	2,84	0,25	F	1187	86,5	2,68	0,23	M
991	63,9	3,14	0,33	M	1389	88,6	3,21	0,25	F	1381	91,3	3,84	0,29	M	1280	87,8	2,85	0,25	F
1023	83,3	2,5	0,28	F	1345	88,0	3,14	0,24	M	1450	91,8	3,86	0,3	F	911	86,0	2,53	0,29	M
1054	86,9	2,9	0,29	M	1480	92,2	3,68	0,27	F	1247	90,0	3,12	0,26	M	1342	94,4	2,93	0,23	M
915	78,4	2,3	0,26	F	1405	93,1	3,56	0,29	F	1220	90,1	3,00	0,27	F	1197	91,5	3,01	0,26	M
1202	84,6	3,14	0,29	F	1273	86,6	3,6	0,33	F	1208	87,8	3,32	0,29	M	1007	82,4	2,40	0,25	M
1126	75,1	2,93	0,29	F	1289	85,4	2,95	0,26	F	1282	91,0	3,09	0,27	F	996	84,7	2,58	0,27	M
1368	88,3	2,66	0,22	F	1303	87,8	3,78	0,30	M	1301	88,9	3,62	0,32	F	1315	91,3	2,47	0,19	M
884	82,1	2,32	0,29	F	1045	81,7	2,8	0,28	M	1443	94,2	3,10	0,24	F	905	82,9	2,31	0,26	M
982	80,5	2,44	0,28	F	1107	85,5	2,71	0,28	F	1335	90,8	3,22	0,27	F	1123	86,2	2,59	0,27	F
1139	89,5	2,72	0,26	F	1391	90,5	3,31	0,25	M	1331	89,4	3,82	0,32	F	1303	90,4	3,16	0,25	M
Média ± DP				M/F	Média ± DP				M/F	Média ± DP				M/F	Média ± DP				M/F
1077,3 ± 162	83,0 ± 6,4	2,79 ± 0,7	0,29 ± 0,03	0,46	1300,5 ± 148	88,2 ± 4,1	3,19 ± 0,37	0,27 ± 0,03	1,11	1333,7 ± 82	90,3 ± 2,4	3,34 ± 0,43	0,27 ± 0,03	0,46	1152,6 ± 164	87,4 ± 4,5	2,76 ± 0,30	0,26 ± 0,03	1,71



Quadro 11 – Coeficientes isométrico (Ki) e alométrico (Ka).

Minho		Lima		Cávado		Douro		Vouga		Mondego		Tejo		Guadiana	
Ki	Ka	Ki	Ka	Ki	Ka	Ki	Ka	Ki	Ka	Ki	Ka	Ki	Ka	Ki	Ka
1,60	1,89	1,66	1,46	1,75	1,39	1,69	1,26	1,67	1,48	1,97	1,49	1,81	1,10	1,73	1,23
1,99	1,79	1,81	1,86	1,12	*	1,64	1,29	1,43	*	2,00	1,46	1,63	1,18	1,42	1,19
1,81	1,87	1,16	1,76	1,66	1,58	1,74	1,33	1,74	2,14	1,66	1,28	1,83	*	1,61	1,18
1,70	1,83	1,56	1,51	1,62	1,51	1,68	1,36	1,75	1,80	1,83	1,72	1,59	1,13	1,79	1,32
1,83	1,70	1,97	2,04	1,62	1,27	2,26	*	1,49	1,73	1,52	1,46	1,54	1,08	1,57	1,58
1,58	1,79	1,68	1,45	1,67	1,35	1,69	1,10	1,53	1,46	1,72	1,75	1,65	1,14	1,62	1,52
1,71	1,80	1,61	1,51	1,72	1,73	1,50	1,01	1,58	1,61	1,72	1,80	1,69	1,05	1,57	1,40
2,02	1,48	1,53	1,92	1,86	2,23	1,87	1,27	1,71	2,23	1,74	1,24	1,69	1,11	1,57	1,81
2,03	2,46	1,77	1,45	2,11	2,04	1,68	1,11	1,62	1,40	1,69	1,58	1,89	1,04	1,77	1,51
2,21	*	1,63	1,52	2,16	1,32	1,54	1,07	*	*	1,83	1,60	1,75	1,20	1,72	1,53
1,74	2,09	1,78	1,86	1,80	2,04	1,65	1,14	1,56	1,54	1,90	1,63	1,67	1,16	1,39	1,17
1,77	1,72	1,59	1,36	1,96	2,01	1,82	0,90	1,54	1,70	1,72	1,67	1,65	1,08	1,53	1,66
1,68	1,79	1,60	1,61	2,00	2,29	1,23	*	1,83	1,52	1,54	1,54	1,54	1,02	1,51	1,51
1,70	1,79	1,45	1,08	1,72	1,67	1,87	1,02	1,79	1,84	1,69	1,39	1,71	1,05	1,73	1,30
1,57	1,50	1,64	1,56	2,09	2,12	1,71	1,20	*	*	1,82	1,44	1,52	1,03	1,57	1,27
1,70	1,66	1,79	1,47	1,92	1,73	1,60	1,10	1,80	2,07	1,85	1,58	1,64	1,04	1,67	1,65
1,67	1,67	1,68	1,42	1,72	1,59	1,73	1,17	1,42	1,35	1,86	1,30	1,58	1,17	1,54	1,17
1,80	1,98	1,70	1,01	1,77	1,62	1,79	1,47	1,68	1,51	1,55	1,23	1,62	1,09	1,52	1,29
1,66	1,45	1,73	1,42	1,66	2,18	1,63	1,16	1,44	1,73	1,81	1,68	1,69	1,09	1,71	1,65
Média ± DP		Média ± DP		Média ± DP		Média ± DP		Média ± DP		Média ± DP		Média ± DP		Média ± DP	
1,74 ±	1,79 ±	1,67 ±	1,54 ±	1,79 ±	1,76 ±	1,70 ±	1,18 ±	1,63 ±	1,69 ±	1,76 ±	1,52 ±	1,67 ±	1,10 ±	1,61 ±	1,42 ±
0,17	0,23	0,12	0,26	0,23	0,34	0,20	0,14	0,14	0,27	0,13	0,17	0,10	0,05	0,11	0,20

\*) *outliyer* não considerado para calcular o valor do declive (b) da recta de regressão utilizada para obter o factor de condição alométrico.

**Quadro 12 – Percentagem de água perdida durante o processo de liofilização (%H<sub>2</sub>O), rendimento da extracção dos lípidos totais (μ) e lípidos totais, em g, por g de músculo cardíaco (LT/Pc).**

Minho			Lima			Cávado			Douro			Vouga			Mondego			Tejo			Guadiana		
%H <sub>2</sub> O	μ	LT/Pc	%H <sub>2</sub> O	μ	LT/ Pc	%H <sub>2</sub> O	μ	LT/ Pc	%H <sub>2</sub> O	μ	LT/ Pc	%H <sub>2</sub> O	μ	LT/ Pc	%H <sub>2</sub> O	μ	LT/ Pc	% H <sub>2</sub> O	μ	LT/ Pc	%H <sub>2</sub> O	μ	LT/ Pc
73,13	5,50	0,13	70,23	6,60	0,21	74,71	6,00	0,25	77,36	6,88	0,45	69,09	8,73	0,33	75,51	7,65	0,49	69,42	8,46	0,27	78,35	6,88	0,38
74,69	6,47	0,24	71,09	6,00	0,24	72,79	5,40	0,17	77,19	6,93	0,41	66,19	9,67	0,41	76,46	7,72	0,51	70,68	6,70	0,19	75,49	6,54	0,41
74,54	6,91	0,32	72,03	5,40	0,16	77,85	5,50	0,08	77,47	6,67	0,45	70,73	7,31	0,28	75,80	7,49	0,46	64,71	8,21	0,30	75,08	7,35	0,49
73,24	6,31	0,25	70,98	6,30	0,27	74,37	5,50	0,17	77,49	6,68	0,48	74,08	6,63	0,21	74,60	7,89	0,70	70,46	6,96	0,24	75,99	7,34	0,47
76,26	6,49	0,24	70,79	6,30	0,18	74,03	6,00	0,32	75,52	7,76	0,59	75,21	5,86	0,20	75,33	8,93	0,58	71,04	6,99	0,19	73,94	7,46	0,41
75,44	6,29	0,27	68,55	6,80	0,29	72,57	6,30	0,26	77,55	6,61	0,41	70,18	6,56	0,25	74,58	8,48	0,59	73,47	6,30	0,17	75,20	7,81	0,45
73,76	6,91	0,37	67,73	6,20	0,26	74,37	5,80	0,22	79,15	5,79	0,31	73,55	6,11	0,11	75,72	8,18	0,62	72,59	7,31	0,36	75,38	7,08	0,49
72,26	5,48	0,21	70,20	7,10	0,22	74,74	5,90	0,18	76,02	7,33	0,48	76,39	5,77	0,21	78,59	6,89	0,44	71,25	7,47	0,48	75,23	8,85	0,67
75,60	4,89	0,16	71,52	6,50	0,26	74,01	6,40	0,20	75,53	8,21	0,51	72,90	6,52	0,22	74,34	8,21	0,57	70,93	6,86	0,15	73,20	8,09	0,48
70,01	7,37	0,24	71,11	6,10	0,22	74,90	6,10	0,22	79,58	6,28	0,36	73,67	7,22	0,35	70,91	5,89	0,45	71,21	6,40	0,23	74,40	7,29	0,48
73,87	7,85	0,46	70,28	6,50	0,16	77,26	5,20	0,08	77,60	6,77	0,39	72,68	6,98	0,28	66,05	8,40	0,52	72,46	10,87	0,36	75,02	9,78	0,56
73,71	7,11	0,21	72,65	7,20	0,30	70,82	7,10	0,19	74,71	7,10	0,32	73,50	6,33	0,23	70,69	6,87	0,44	70,54	6,60	0,23	76,20	7,97	0,67
67,59	9,40	1,08	71,72	4,80	0,23	71,67	6,80	0,10	75,62	6,68	0,32	69,46	7,59	0,31	72,03	6,39	0,36	72,63	5,89	0,20	74,21	7,64	0,51
56,84	7,22	0,34	74,49	5,90	0,20	68,35	7,10	0,26	75,93	6,76	0,40	71,87	6,70	0,30	70,56	6,60	0,33	71,80	6,07	0,18	73,92	8,09	0,45
70,15	6,91	0,26	72,61	8,40	0,30	72,11	5,80	0,14	76,24	7,10	0,49	73,93	6,80	0,28	71,31	6,25	0,37	71,95	5,43	0,14	74,86	7,16	0,43
72,26	6,84	0,25	74,17	6,00	0,25	72,95	6,70	0,27	75,10	7,19	0,60	71,65	6,16	0,14	71,40	6,90	0,39	70,78	5,98	0,17	76,71	7,02	0,40
71,91	6,92	0,22	72,36	6,00	0,23	73,73	5,60	0,16	76,19	6,59	0,45	71,77	6,65	0,27	70,36	7,18	0,32	72,00	6,32	0,17	75,65	6,82	0,34
76,13	6,29	0,19	73,23	6,60	0,17	72,37	6,50	0,22	74,97	7,43	0,56	60,51	10,16	0,56	70,97	6,78	0,32	71,92	6,51	0,24	76,47	7,18	0,41
73,79	7,35	0,28	71,37	7,60	0,28	72,83	5,60	0,17	73,65	7,75	0,49	74,15	7,02	0,28	70,96	6,70	0,36	73,43	6,18	0,38	75,82	7,79	0,49
Média ± DP			Média ± DP			Média ± DP			Média ± DP			Média ± DP			Média ± DP			Média ± DP			Média ± DP		
72,38	6,76	0,30	71,43	6,44	0,23	73,50	6,07	0,19	76,47	6,97	0,45	71,66	7,09	0,27	72,96	7,34	0,46	71,23	6,92	0,24	75,32	7,59	0,47
±4,37	±0,97	±0,20	±1,69	±0,79	±0,05	±2,14	±0,57	±0,06	±1,51	±0,56	±0,09	±3,61	±1,20	±0,10	±3,01	±0,85	±0,11	±1,89	±1,22	±0,09	±1,18	±0,76	±0,08

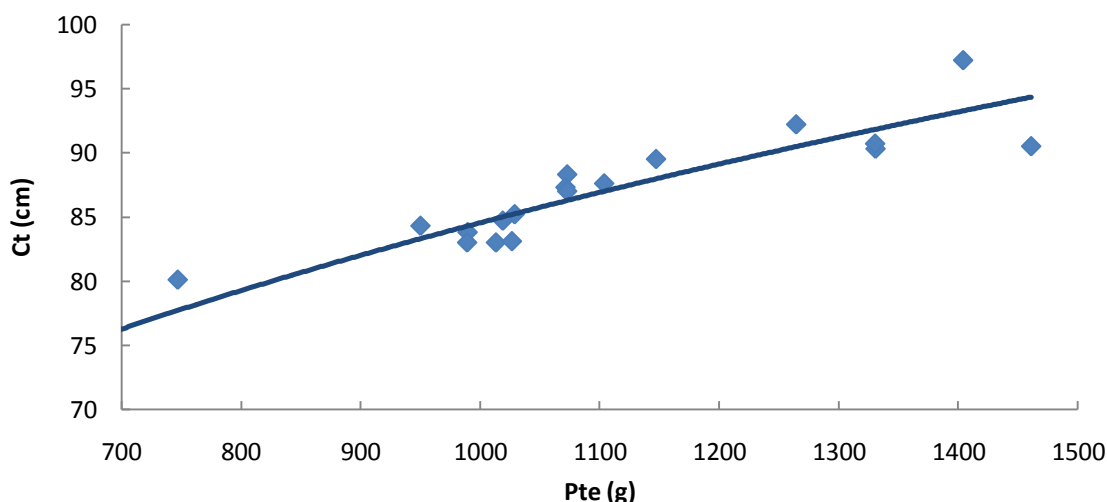


Fig. 14 – Relação entre peso corporal eviscerado (Pte, g) e o comprimento total (Ct, cm) das lampreias marinhas da bacia do Lima.

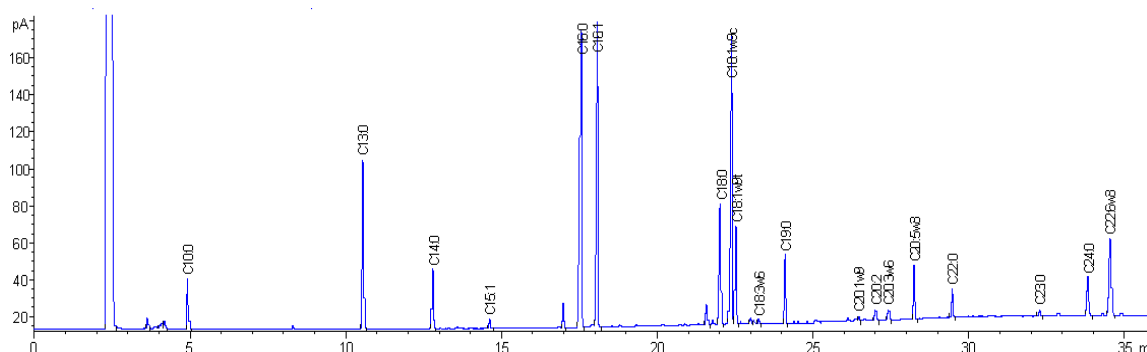
## 4.2. Perfil dos ácidos gordos do músculo cardíaco

A desvantagem na utilização dos perfis em ácidos gordos de um tecido para caracterizar e/ou discriminar grupos ou populações reside no facto dos ácidos gordos dos tecidos puderem ser influenciados por diversos factores ambientais, entre os quais, a dieta (Joensen, Steingrund *et al.*, 2000). Todavia, alguns estudos têm demonstrado que a composição dos ácidos gordos do tecido cardíaco apresenta uma componente que é independente de diversos factores ambientais, podendo mesmo resultar da influência genética (Mjaavatten *et al.*, 1998).

Neste trabalho, escolheu-se precisamente o tecido cardíaco na medida em que é constituído, em mais de 90%, por lípidos estruturais, nomeadamente fosfolípidos e, consequentemente, apresenta um teor baixo de triacilgliceróis, estes últimos fortemente afectados pela composição em ácidos gordos proveniente da dieta (Czesny *et al.*, 2000; Joensen, Steingrund *et al.*, 2000; McKenzie, 2001). De facto, ensaios preliminares realizados nas nossas amostras de tecido cardíaco revelaram que mais de 90% dos lípidos extraídos eram lípidos polares e apenas 10% correspondiam a triacilgliceróis. Estes resultados estão em concordância com outros trabalhos realizados (Grahl-Nielsen *et al.*, 1990).

No músculo cardíaco das lampreias marinhas das oito bacias hidrográficas identificaram-se 30 ácidos gordos com significado estatístico comparativamente aos 37 ácidos gordos padrão mais C22:5 $\omega$ 3. Os ácidos gordos C4:0, C6:0, C11:0 e C15:1 não fazem parte dos lípidos totais do músculo cardíaco e os ácidos gordos C8:0 e C17:1 aparecem esporadicamente em algumas bacias em número de um ou dois indivíduos. Como se pode verificar no cromatograma da figura 15, os ácidos gordos saturados com maior expressão nos lípidos totais do músculo cardíaco são, por ordem

decrecente, C16:0, C18:0, C13:0, seguido do C14:0 e C20:0. Os ácidos gordos monoinsaturados com maior área de pico são o C18:1 $\omega$ 9 seguido do C16:1. Relativamente, aos poliinsaturados os ácidos gordos que apresentam maior área de pico são o C22:6 $\omega$ 3 seguido do C22:5 $\omega$ 3 e C20:3 $\omega$ 3.



**Fig. 15 – Cromatograma dos ésteres metílicos dos ácidos gordos dos lípidos totais do músculo cardíaco de uma lampreia-marinha da bacia do Tejo. O padrão interno usado foi o éster metílico do C19:0.**

O catabolismo dos ácidos gordos de cadeia curta e média é essencial na produção rápida de energia metabólica e, a consequente baixa taxa de deposição nos tecidos de peixe pode explicar a inexistência de C6:0 e C8:0 e também as baixas percentagens de C10:0 e C12:0 no músculo cardíaco (Tocher, 2003).

Da análise do Quadro 14, verifica-se que a classe de ácidos gordos predominante nos lípidos totais do coração é a classe dos ácidos gordos saturados, cujas percentagens variaram entre 35%, nos indivíduos das bacias hidrográficas do Mondego e Guadiana e 44% nos animais da bacia hidrográfica do Vouga. As duas maiores exceções registaram-se nos animais das bacias do Minho e do Tejo, nas quais a percentagem de ácidos gordos saturados foi idêntica à dos ácidos gordos monoinsaturados. Em relação aos ácidos gordos monoinsaturados, pode constatar-se uma maior variação entre as bacias para os valores percentuais obtidos, sendo o menor registado nos animais do Guadiana (20%) e o mais elevado nas lampreias do Minho (39%). No que diz respeito aos ácidos gordos poliinsaturados, verificou-se que os valores oscilaram entre 16 %, obtido para as lampreias do Minho e Vouga e 27 % para os animais do Douro.

Em todas as bacias verificou-se que o ácido gordo saturado mais representativo foi o C16:0 (10,5 – 22,0%), sendo seguido pelo C18:0 (5,3 - 9,7%) para os indivíduos das bacias do Minho, Vouga e Tejo e pelo C13:0 (9,3-16,8%) no caso dos animais das restantes bacias hidrográficas. A exceção reside nos animais da bacia do Guadiana, onde inexplicavelmente o C13:0 foi o ácido gordo saturado com maior percentagem (13,8%). Relativamente à classe dos ácidos gordos monoinsaturados, verificou-se que o C18:1 $\omega$ 9 foi sempre o mais representativo (11,9-23,6%) logo seguido pelo C16:1 (6,3-14,1%) para as lampreias de todas as bacias hidrográficas. No que diz respeito aos ácidos gordos poliinsaturados, verificou-se que os mais abundantes foram o C22:6  $\omega$ 3 (5,2-13,8%) e o C22:5 $\omega$ 3 (2,8-5,2%) para os animais de todas as bacias hidrográficas com exceção para as lampreias do Vouga,

onde o C20:3 $\omega$ 3 apresentou a segunda maior percentagem (3,0%). O ratio C22:6 $\omega$ 3/C20:5 $\omega$ 3 permite ainda constatar que existe preservação de C22:6 $\omega$ 3 relativamente ao C20:5 $\omega$ 3.

Como já atrás se referiu, os ácidos gordos C16:0, C18:1 $\omega$ 9, C20:1 $\omega$ 9 e C22:6 $\omega$ 3 apresentaram maior peso relativo. Estes estão associados à produção de energia, podendo indiciar que contribuem para a actividade cardíaca (Henderson *et al.*, 1984a; Henderson *et al.*, 1984b; Henderson *et al.*, 1989).

Embora os ácidos gordos insaturados no seu conjunto, *i.e.*, monoinsaturados e poliinsaturados, tenham apresentado valores percentuais muito semelhantes entre todas as bacias (41,8-56,0%), a proporção de ácidos gordos poliinsaturados no conjunto dos ácidos gordos insaturados já mostrou uma maior variação. Nos animais do Douro e Guadiana, mais de 50 % dos ácidos gordos insaturados são efectivamente ácidos poliinsaturados, enquanto nos indivíduos do Minho, apenas 29% dos ácidos gordos insaturados são poliinsaturados. Conjuntamente com o Minho, os animais das bacias do Vouga e do Tejo também apresentaram baixa proporção de ácidos gordos poliinsaturados (31,3 e 33,1% respectivamente). Já os animais das restantes bacias assinalaram valores entre 43,2 e 46,4%.

Os ácidos gordos insaturados são essenciais na manutenção de estruturas, funções e integridade das membranas celulares. Os ácidos gordos poliinsaturados com mais de 20 átomos de carbono e três insaturações conferem rigidez das membranas celulares, já os ácidos gordos saturados e os monoinsaturados conferem flexibilidade (Sargent, 1995; Hajri *et al.*, 2002). O equilíbrio entre estas classes de ácidos contribui assim para a determinação da fluidez das membranas. Dada a necessidade de flexibilidade no músculo cardíaco seria de esperar que as percentagens de ácidos gordos saturados e monoinsaturados fossem muito superiores aos ácidos gordos com mais de 20 átomos de carbono e três insaturações.

**Quadro 14 – Composição dos ácidos gordos do músculo cardíaco de lampreia-marinha de oito bacias hidrográficas Portuguesas. SFA – Ácidos gordos saturados; MUFA – Ácidos gordos monoinsaturados; PUFA – Ácidos gordos poliinsaturados e ND – Não detectável.**

	Ácido gordo	Minho	Lima	Cávado	Douro	Vouga	Mondego	Tejo	Guadiana
<b>SFA</b>	<b>C10:0</b>	1,274 ± 0,928	4,287 ± 2,269	3,439 ± 1,652	4,403 ± 1,463	<b>1,689 ± 1,374</b>	3,594 ± 2,520	1,243 ± 1,101	3,604 ± 1,540
	<b>C12:0</b>	0,155 ± 0,172	0,137 ± 0,164	0,168 ± 0,211	0,089 ± 0,135	<b>0,077 ± 0,079</b>	0,113 ± 0,180	0,060 ± 0,051	0,046 ± 0,110
	<b>C13:0</b>	4,186 ± 4,567	12,977 ± 4,254	9,045 ± 4,444	10,844 ± 6,032	<b>4,693 ± 4,496</b>	7,526 ± 5,497	4,215 ± 4,220	13,817 ± 5,987
	<b>C14:0</b>	2,767 ± 1,542	1,882 ± 0,867	1,389 ± 0,521	0,983 ± 0,359	<b>2,007 ± 0,614</b>	1,577 ± 0,606	1,872 ± 0,456	0,825 ± 0,323
	<b>C15:0</b>	0,018 ± 0,023	0,131 ± 0,511	0,483 ± 0,794	0,320 ± 1,137	<b>ND</b>	0,276 ± 0,739	0,015 ± 0,058	0,148 ± 0,146
	<b>C16:0</b>	19,815 ± 3,055	15,293±3,479	13,481 ± 3,731	12,248 ± 3,933	<b>22,036 ± 2,775</b>	14,022 ± 3,226	20,128 ± 2,262	10,483 ± 1,921
	<b>C17:0</b>	0,050 ± 0,061	0,075 ± 0,212	0,027 ± 0,051	0,009 ± 0,041	<b>0,037 ± 0,053</b>	0,630 ± 0,344	0,085 ± 0,151	0,840 ± 0,231
	<b>C18:0</b>	8,745 ± 1,981	6,898 ± 1,468	6,076 ± 1,298	6,306 ± 1,489	<b>9,734 ± 1,649</b>	6,274 ± 1,218	9,130 ± 1,492	5,273 ± 0,946
	<b>C20:0</b>	2,153 ± 1,641	0,198 ± 0,234	0,261 ± 0,252	0,139 ± 0,176	<b>3,340 ± 2,061</b>	0,163 ± 0,252	1,790 ± 2,104	0,038 ± 0,065
	<b>C22:0</b>	0,365± 0,501	0,589 ± 0,495	0,639 ± 0,587	0,157 ± 0,170	<b>0,334 ± 0,440</b>	0,437 ± 1,100	0,322 ± 0,305	0,021 ± 0,062
	<b>C23:0</b>	0,161± 0,254	0,178± 0,322	0,266 ± 0,530	0,450 ± 0,839	<b>0,032 ± 0,102</b>	0,277 ± 0,503	0,006 ± 0,024	0,174 ± 0,379
	<b>C24:0</b>	ND	0,425 ± 0,549	0,441 ± 0,507	ND	<b>ND</b>	0,245 ± 0,600	0,118 ± 0,247	0,021 ± 0,066
	<b>ΣSFA</b>	<b>39,689</b>	<b>43,07</b>	<b>35,715</b>	<b>35,948</b>	<b>43,979</b>	<b>35,134</b>	<b>38,984</b>	<b>35,290</b>
<b>MUFA</b>	<b>C14:1</b>	0,118 ± 0,105	0,085 ± 0,093	0,107 ± 0,220	0,207 ± 0,451	0,055± 0,070	0,027 ± 0,046	0,058 ± 0,068	0,004 ± 0,019
	<b>C16:1</b>	14,069 ± 4,001	10,488 ± 3,507	10,639 ± 3,805	6,829 ± 2,647	12,209 ± 4,296	10,457 ± 3,523	13,282 ± 2,587	6,307 ± 1,692
	<b>C17:1</b>	0,001 ± 0,005	0,004 ± 0,014	0,008 ± 0,028	ND	ND	0,024 ± 0,078	0,044± 0,187	0,001 ± 0,003
	<b>C18:1ω9</b>	23,187 ± 3,675	11,915 ± 4,677	16,516 ± 3,135	16,404± 5,788	18,704 ± 2,735	11,224 ± 7,464	23,552 ± 2,668	13,374 ± 2,555
	<b>C20:1ω9</b>	1,143 ± 0,406	0,504 ± 0,199	0,451 ± 0,163	0,366 ± 0,150	1,311 ± 0,433	0,333 ± 0,228	1,050 ±0,457	0,280 ± 0,096
	<b>C22:1ω9</b>	0,329 ± 0,216	0,515 ± 0,719	0,496 ± 0,687	0,052 ± 0,151	0,109 ± 0,213	0,493 ± 1,586	0,166 ± 0,187	0,029 ± 0,071
	<b>C24:1ω9</b>	0,652 ± 0,468	1,063 ± 1,230	1,200 ± 1,198	0,056 ± 0,172	0,374 ± 0,412	0,466 ± 0,977	0,375 ± 0,316	0,212 ± 0,372
	<b>ΣMUFA</b>	<b>39,499</b>	<b>24,574</b>	<b>29,417</b>	<b>23,914</b>	<b>32,762</b>	<b>23,024</b>	<b>38,527</b>	<b>20,207</b>
<b>PUFA</b>	<b>C18:2ω6</b>	0,403 ± 0,171	0,342 ± 0,253	0,396 ± 0,156	0,243 ± 0,193	ND	0,200 ± 0,220	0,356 ± 0,143	0,312 ± 0,205
	<b>C18:3ω6</b>	0,148 ± 0,152	0,060 ± 0,141	0,063 ± 0,131	0,009 ± 0,037	ND	0,047 ± 0,166	ND	0,007 ± 0,021

<b>C18:3ω3</b>	0,066 ± 0,113	0,054 ± 0,114	0,071 ± 0,159	0,018 ± 0,057	0,055 ± 0,105	0,075 ± 0,234	0,050 ± 0,075	0,003 ± 0,010
<b>C20:2</b>	1,128 ± 2,673	0,384 ± 0,472	0,388 ± 0,505	0,075 ± 0,089	0,854 ± 0,789	0,155 ± 0,330	1,465 ± 3,114	0,010 ± 0,029
<b>C20:3ω6</b>	0,588 ± 1,509	0,158 ± 0,254	0,319 ± 0,519	0,012 ± 0,053	0,114 ± 0,178	0,241 ± 0,790	0,230 ± 0,339	ND
<b>C20:3ω3</b>	2,761 ± 1,456	2,621 ± 1,283	3,233 ± 1,402	2,650 ± 2,022	3,002 ± 1,284	2,508 ± 1,563	3,038 ± 1,071	3,053 ± 0,951
<b>C20:4ω6</b>	0,270 ± 0,189	0,062 ± 0,173	0,333 ± 0,425	0,020 ± 0,048	0,230 ± 0,266	0,329 ± 0,796	0,191 ± 0,178	0,027 ± 0,116
<b>C20:5ω3</b>	2,400 ± 0,902	2,603 ± 1,193	2,481 ± 0,935	3,824 ± 1,191	2,407 ± 0,573	2,535 ± 1,252	2,162 ± 0,612	2,977 ± 0,545
<b>C22:2</b>	0,359 ± 0,455	0,246 ± 0,523	0,433 ± 0,619	1,201 ± 1,957	0,217 ± 0,412	1,831 ± 3,116	0,145 ± 0,295	0,262 ± 0,507
<b>C22:5ω3</b>	2,841 ± 0,816	3,957 ± 1,694	4,241 ± 2,466	5,217 ± 1,554	2,936 ± 1,144	3,943 ± 2,067	3,254 ± 0,919	4,289 ± 0,780
<b>C22:6ω3</b>	5,283 ± 2,208	8,252 ± 3,366	12,153 ± 4,714	13,844 ± 5,599	6,416 ± 2,326	8,092 ± 5,235	6,676 ± 1,735	10,700 ± 3,140
<b>ΣPUFA</b>	<b>16,247</b>	<b>18,739</b>	<b>24,111</b>	<b>27,113</b>	<b>16,231</b>	<b>19,956</b>	<b>17,567</b>	<b>21,640</b>
<b>Σ(PUFA+MUFA)</b>	<b>55,746</b>	<b>43,313</b>	<b>53,528</b>	<b>51,027</b>	<b>48,993</b>	<b>42,980</b>	<b>56,094</b>	<b>41,847</b>
<b>ΣUFA/ΣSFA</b>	1,40	1,00	1,49	1,42	1,11	1,22	1,44	1,19
<b>Σω3</b>	13,351	27,487	22,179	25,553	14,816	17,153	15,180	21,022
<b>Σ Impares</b>	4,416	13,365	9,829	11,623	4,762	8,733	4,365	14,980
<b>Σω6</b>	1,409	0,622	1,111	0,284	0,344	0,817	0,777	0,346
<b>Σω3/Σω6</b>	9,476	44,191	19,963	89,975	43,069	20,995	19,537	60,757
<b>C20:4ω6/ C20:5ω3</b>	0,113	0,024	0,134	5,2E-3	0,096	0,130	0,088	9,1E-3
<b>C22:6ω3/C20:5ω3</b>	2,201	3,170	4,898	3,620	2,666	3,192	3,088	3,594

**Nota: As diferenças estatísticas estão assinaladas apenas nos quadros em anexo.**

Os ácidos gordos poliinsaturados desempenham um papel vital em processos fisiológicos, tais como a função cardiovascular, no aporte energético e no controlo da temperatura corporal. Nos mamíferos estes ácidos gordos exercem um papel fundamental na modulação da actividade da bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático do coração ao nível da excitabilidade eléctrica da membrana nos cardiomiócitos (Leaf *et al.*, 1988; Kang *et al.*, 1995; Ruf *et al.*, 2008). Incluídos nesta classe, os ácidos gordos  $\omega 3$  e  $\omega 6$  exercem funções reguladoras importantes na cascata do ácido  $\text{C20:4}\omega 6$  (Leaf *et al.*, 1988).

Da análise do Quadro 14, constata-se ainda que o *ratio*  $\omega 3/\omega 6$  apresentou valores completamente distintos e muito afastados dos valores tipicamente assumidos para os peixes marinhos e que variam entre 4,7 e 14,4 (Henderson and Tocher, 1987). Todavia, o coração é considerado um órgão estável e não sujeito a alterações significativas induzidas pela dieta na medida em que é um órgão com baixo teor de triacilgliceróis relativamente aos fosfolípidos e, consequentemente, menos passivamente afectado pelos lípidos provenientes da dieta (Joensen *et al.*, 2000).

A razão entre os ácidos gordos essenciais  $\text{C18:3}\omega 3/\text{C18:3}\omega 6$  é importante na produção de  $\text{C20:4}\omega 6$  e  $\text{C22:6}\omega 3$  (McKenzie *et al.*, 1998; McKenzie *et al.*, 1999; McKenzie, 2001). Quando esta razão é elevada pode inibir a conversão de  $\text{C18:3}\omega 3$  em  $\text{C22:6}\omega 3$  e quando é baixa pode inibir a conversão de  $\text{C18:2}\omega 6$  em  $\text{C20:4}\omega 6$  (McKenzie *et al.*, 1998; McKenzie *et al.*, 1999; McKenzie, 2001). No presente estudo, existem em todas as bacias percentagens muito superiores de  $\text{C18:2}\omega 6$ , sugerindo que pode, no músculo cardíaco das lampreias, ocorrer preferencialmente a via de conversão de  $\text{C18:3}\omega 3$  em  $\text{C22:6}\omega 3$ . A razão entre os ácidos gordos  $\text{C22:6}\omega 3/\text{C20:5}\omega 3$  é inerente à espécie e não é influenciada pela dieta (McKenzie *et al.*, 1998; McKenzie *et al.*, 1999; McKenzie, 2001).

Os ácidos gordos  $\text{C20:4}\omega 6$ ,  $\text{C20:3}\omega 6$  e  $\text{C20:5}\omega 3$  são precursores de eicosanóides, com relevância no controlo da frequência cardíaca e de processos inflamatórios, regulando a síntese de prostaglandinas. Os ácidos gordos  $\omega 3$  podem inibir a produção de mediadores inflamatórios reduzindo os níveis de ácidos gordos livres existentes nas células e os níveis de triacilgliceróis no sangue que irriga o músculo cardíaco. No entanto, os mediadores inflamatórios produzidos a partir do  $\text{C20:5}\omega 3$  tem efeitos mais leves do que os derivados do ácido araquidónico (Bowman *et al.*, 1980; Gibson, 1983). Estes factos podem ser corroborados com o facto da percentagem de ácidos gordos  $\omega 3$  no músculo cardíaco ser muito superior à de  $\omega 6$ .

Por outro lado, os ácidos gordos poliinsaturados também são favoráveis a processos de peroxidação e representam uma importante fonte de espécies de radicais livres de oxigénio (Ruf *et*



al., 2008). Os ácidos gordos  $\omega 3$  desempenham um papel crucial na prevenção e protecção de danos oxidativos nas membranas celulares e também na redução de radicais livres nos tecidos (Sargent, 1995). Estes processos são essenciais para o bom funcionamento fisiológico do coração e pode explicar a razão da elevada percentagem destes ácidos gordos no músculo cardíaco das lampreias marinhas.

Para se testar se o perfil de ácidos gordos dos lípidos totais do coração diferia entre os animais das várias bacias e entre géneros foi realizada uma análise de modelo geral linear vulgarmente designada nos programas estatísticos por GLM, a qual permitiu a análise de variância para as variáveis dependentes (*i.e.*, ácidos gordos) mediante o uso de dois factores fixos: bacia hidrográfica e género. Deste modo, as variáveis utilizadas dividem a população em grupos e permitem testar quer a hipótese nula  $H_0$  sobre o efeito de qualquer das variáveis (bacia hidrográfica ou género,) quer a respectiva interacção, nas variáveis dependentes para os vários grupos a analisar.

Os nossos resultados revelaram que o factor género assim como a interacção dos factores bacia hidrográfica\*género não exerceram um efeito significativo ( $p>0,187$  e  $p>0,134$ , respectivamente) sobre o perfil de ácidos gordos dos lípidos totais do coração. Todavia, o factor bacia hidrográfica já se revelou significativo ( $p<0,001$ ), o que indica que as lampreias provenientes das várias bacias hidrográficas analisadas apresentam diferente perfil de ácidos gordos dos lípidos totais do coração, contrariando assim a nossa hipótese nula  $H_0$ : lampreias de bacias hidrográficas distintas apresentam idêntico perfil de ácidos gordos dos lípidos totais do coração.

Em virtude de se terem analisado 37 ácidos gordos em animais de 8 bacias hidrográficas, apenas se fará um resumo dos resultados mais evidentes, remetendo os restantes para as respectivas tabelas em anexo a fim de não se tornar fastidiosa a apresentação dos resultados.

Desta forma, após a análise de GLM, é evidente um padrão para o C10:0, no qual os animais do Tejo, Vouga e Minho apresentaram os valores significativamente mais baixos ( $p<0,05$ ) que os animais das restantes bacias. Relativamente ao C13:0, observou-se que os animais do Tejo, Minho e Vouga se caracterizaram pelo valor significativamente menor ( $p<0,05$ ) quando comparados com os animais das restantes bacias e, com excepção para as lampreias do Mondego, as quais registaram valores significativamente menores ( $p<0,05$ ) que as do Douro, Lima, Cávado e Guadiana. No que concerne ao C14:0, verificou-se que os indivíduos do Minho apresentaram valores significativamente superiores ( $p<0,05$ ) aos animais do Guadiana, Mondego, Douro, Cávado e Lima. Em relação ao C16:0, os maiores destaques vão para os valores significativamente superiores ( $p<0,05$ ) obtidos nos animais do Tejo, Vouga e Minho relativamente aos animais das restantes bacias e, em oposição, o menor valor observado nos animais do Guadiana. Em relação ao C17:0, as lampreias das bacias do Guadiana

e do Mondego apresentaram os valores significativamente mais elevados. A análise do C18:0 permite verificar que as lampreias do Tejo, Minho e Vouga apresentaram o valor significativamente maior ( $p < 0,05$ ).

Quando se analisam cada um dos ácidos gordos monoinsaturados, o primeiro grande destaque vai para o C16:1 e para as lampreias do Douro e do Guadiana na medida em que se caracterizaram pelo valor significativamente menor ( $p < 0,05$ ). Relativamente ao C18:1 $\omega$ 9, os valores mais elevados foram obtidos nas lampreias do Minho e Tejo e os mais baixos nos animais do Mondego e Lima. Os animais do Tejo, Vouga e Minho registaram ainda os valores significativamente ( $p < 0,05$ ) mais elevados para o C20:1 $\omega$ 9.

No que diz respeito aos ácidos gordos poliinsaturados, os indivíduos do Douro apresentaram um valor significativamente mais baixo ( $p < 0,05$ ) de C20:4 $\omega$ 6 que as lampreias do Tejo, Vouga, Minho e Mondego. Relativamente aos ácidos C20:5 $\omega$ 3, C22:5 $\omega$ 3 e C22:6 $\omega$ 3, existem algumas diferenças significativas dispersas pelos animais das várias bacias destacando-se os valores significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) de C20:5 $\omega$ 3 e C22:6 $\omega$ 3 dos animais do Guadiana comparativamente aos do Minho e Vouga.

Ainda após a análise de GLM podemos constatar que para os vários ácidos gordos, a variabilidade que pode ser explicada pelo factor bacia é bem distinta podendo assim ser evidenciado qual ou quais os ácidos gordos que foram mais afectados pelas bacias. Daqueles que foram destacados anteriormente, pode afirmar-se que a ordem decrescente foi: C17:0 (74,1%); C20:1 $\omega$ 9 (63,2%); C16:0 (59,9%); C20:4 $\omega$ 6 (51,9%); C18: 1 $\omega$ 9 (51,5%); C14:0 (45,2%); C10:0 (36,4%); C13:0 (35,2%); C20:5 $\omega$ 3 (20,2%); C22:5 $\omega$ 3 (17,2%) e C22:6 $\omega$ 3 (13,8%). Consequentemente, pode afirmar-se que o ácido gordo cuja variação foi mais afectada pelo factor bacia hidrográfica foi o C17:0 (74,1%) e o oposto detectou-se para o C22:6 $\omega$ 3 (13,8%).

Em seguida procedeu-se à análise discriminante multivariada (MDA) a fim de se conhecer qual ou quais os ácidos gordos que mais contribuíam para as diferenças no perfil de ácidos gordos do coração entre os animais das bacias hidrográficas analisadas (Quadros 15 e 16).

A análise discriminante multivariada, baseada no perfil em ácidos gordos dos lípidos totais do coração, provou ser estatisticamente significativa (Quadro 17) e correspondeu a 100% da variação total sendo que, a taxa de classificação total estimada pelo procedimento de validação cruzada foi de 83,6%. A separação de todos os centróides é estatisticamente significativa (Quadro 18). Da observação do Quadro 19 pode constatar-se que 100% das lampreias do Guadiana e do Tejo não se agrupam com as lampreias de nenhuma das restantes bacias. É ainda interessante constatar que cerca de 84,2% das lampreias do Cávado estão correctamente classificadas apesar de 15,8%

revelarem características comuns com os animais do Douro. Ao nível do Vouga, também se verificou que de 89,5% das lampreias estão correctamente classificadas apesar de as restantes revelarem características comuns com os animais do Lima e Tejo. No Lima, 63,2% dos animais revelou estar correctamente classificado, sendo que dos restantes, 31,6% partilhou características com os animais do Cávado. No Mondego, registou-se 73,7% de lampreias correctamente classificadas, partilhando as restantes características com os animais do Guadiana e Vouga. No que diz respeito aos indivíduos do Minho, 78,9% encontram-se correctamente classificados enquanto 15,8% e 5,3% revelaram semelhanças com os indivíduos do Vouga e do Tejo respectivamente. De igual forma, no Douro 78,9% encontram-se correctamente classificados enquanto 15,8% e 5,3% revelaram semelhanças com os indivíduos do Cávado e do Tejo respectivamente.

Da análise do Quadro 20, verifica-se que os ácidos gordos com maior índice de potência, ou seja, poder discriminante são por ordem decrescente: C17:0 (0,15); C20:1 $\omega$ 9 (0,10); C16:0 (0,09); C20:4 $\omega$ 6 (0,06); C18:  $\omega$ 9 (0,06); C14:0 (0,05); o C23:0 C24:0 C24:1 $\omega$ 9 C18:3 $\omega$ 3,  $\omega$ 3,  $\omega$ 6, C22:6 $\omega$ 3/ C20:5 $\omega$ 3 (0,02) e o C20:5 $\omega$ 3, C22:5 $\omega$ 3, C15:0, C22:0 (0,01).

**Quadro 15 – Valor de Eigen e correlação canónica discriminante obtida nas oito bacias hidrográficas.**

Função	Valor Eigen	% de Variância	Acumulação da % de variância	Correlação canónica
1	8,824*	49,7	49,7	0,948
2	3,634*	20,5	70,2	0,886
3	2,280*	12,8	83,0	0,834
4	1,207*	6,8	89,8	0,740
5	0,817*	4,6	94,4	0,671
6	0,648*	3,7	98,1	0,627
7	0,338*	1,9	100,0	0,502

\*) Discriminantes canónicas para as 7 funções utilizadas nesta análise.

**Quadro 16 – Resultados do teste Wilks' Lambda ( $\Lambda$ ) e Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para verificar a hipótese de que as médias dos centróides das funções são iguais nos oito grupos quando os ácidos gordos dos lipídios totais do tecido cardíaco são separados pela análise discriminante.**

Função teste	$\Lambda$	$\chi^2$	df	Sig.
1 através de 7	0,001	995,211	119	0,000
2 através de 7	0,007	678,768	96	0,000
3 através de 7	0,034	466,394	75	0,000
4 através de 7	0,113	301,881	56	0,000
5 através de 7	0,250	192,227	39	0,000
6 através de 7	0,454	109,516	24	0,000
7 através de 7	0,748	40,302	11	0,000

**Quadro 17 – Resultados do teste Q de Press. N – Total da amostra; n – Total de indivíduos correctamente classificados; k – Número de grupos.**

	N	n	K
Original	152	135	8
Cross-validated (Jackknife)	152	123	8

Press's Q	gdl	limite p<0,05	
809,383459	1	3,841	discrimina
650,586466	1	3,841	discrimina

Quadro 18 – Resultados do Pairwise group comparison - poder discriminante do teste Q Press.

	Press's Q	gdl	limite 0,05	limite 0,01	limite 0,001	significativo
Original	809,383	1	3,841	6,635	10,828	sim
Jackknife	650,586	1	3,841	6,635	10,828	sim

Quadro 19 – Resultados da classificação da análise discriminante das oito bacias hidrográficas.

Grupos	N	% Correcta	Minho	Lima	Cávado	Douro	Vouga	Mondego	Tejo	Guadiana
Minho	18	78,9	15	0	0	0	3	0	1	0
Lima	19	63,2	0	12	6	0	0	0	0	0
Cávado	19	84,2	0	3	16	0	0	0	0	0
Douro	19	78,9	0	0	3	15	0	0	0	1
Vouga	19	89,5	0	1	0	0	17	0	1	0
Mondego	19	73,7	0	0	0	0	1	14	0	4
Tejo	19	100,0	0	0	0	0	0	0	19	0
Guadiana	19	100,0	0	0	0	0	0	0	0	19
Total	152	-	-	-	-	-	-	-	-	-

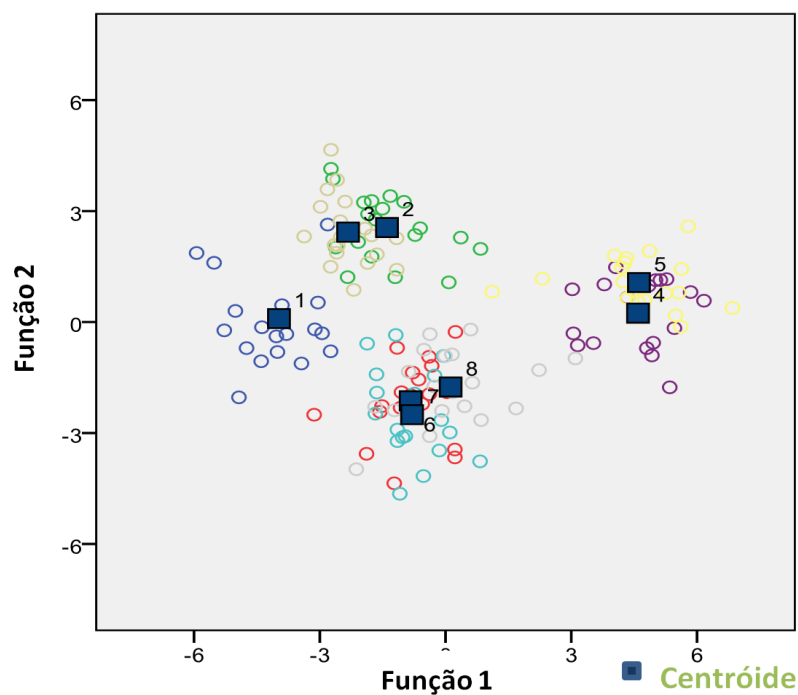


Fig. 16 – Análise da função discriminante canónica nas lampreias das oito bacias hidrográficas, representada por 152 indivíduos e usando 30 ácidos gordos, cuja média apresentava maior variância (símbolos: roxo escuro – Guadiana; azul – Tejo; amarelo – Mondego; verde – Vouga; vermelha – Douro; azul claro – Cávado; roxo claro – Lima e cinzento – Minho).

Quadro 20 – Resultados do índice de potência.

Ácido gordo	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 3	Eixo 4	Eixo 5	Eixo 6	Eixo 7	Índice de potência
C17:0	1,18E-01	9,41E-03	2,00E-02	4,81E-04	1,19E-03	5,89E-03	5,27E-06	0,15
C20:1W9	4,73E-02	4,92E-02	8,83E-04	3,04E-04	4,77E-03	7,97E-05	1,64E-04	0,10
C16:0	4,51E-02	3,43E-02	5,14E-04	8,93E-03	1,05E-03	2,47E-04	2,08E-05	0,09
C18:1W9	4,39E-02	6,68E-03	3,82E-03	2,76E-03	3,40E-04	2,69E-03	7,07E-04	0,06
C20:4W6	1,62E-02	1,20E-04	3,61E-02	6,70E-03	1,31E-03	2,10E-03	2,99E-04	0,06
C14:0	1,66E-02	1,44E-02	6,33E-03	7,36E-03	3,77E-03	3,52E-06	9,49E-05	0,05
C23:0	3,33E-03	1,51E-02	4,21E-04	2,87E-03	1,38E-03	8,12E-04	3,95E-04	0,02
C24:0	4,45E-06	4,58E-03	1,16E-02	3,09E-03	1,09E-03	3,06E-03	3,49E-04	0,02
W3	1,63E-03	4,64E-03	1,35E-03	5,64E-03	1,54E-03	2,13E-03	4,22E-04	0,02
C24:1W9	1,23E-03	9,07E-03	2,53E-03	5,11E-03	5,98E-05	1,68E-03	1,24E-07	0,02
C18:3W3	4,96E-04	6,54E-04	5,58E-03	2,76E-04	8,99E-03	1,00E-03	2,06E-05	0,02
W6	7,33E-03	1,47E-04	1,13E-03	1,53E-04	8,51E-03	5,44E-03	3,92E-04	0,02
ARA/EPA	5,78E-04	6,10E-03	5,59E-04	1,98E-03	1,53E-03	6,85E-06	5,87E-03	0,02
EPA	3,41E-03	3,47E-03	7,40E-04	6,26E-04	2,92E-04	6,09E-04	3,39E-03	0,01
C22:5W3	2,43E-03	1,67E-04	7,66E-05	5,58E-04	1,25E-03	4,33E-03	2,79E-03	0,01
C15:0	2,13E-03	3,62E-03	2,00E-04	2,20E-04	4,79E-05	6,76E-04	2,00E-03	0,01
C22:0	1,17E-03	8,27E-04	2,18E-04	2,97E-03	2,38E-04	2,52E-05	1,04E-03	0,01

A análise dos resultados da MDA revelou uma segregação muito significativa entre as amostras provenientes das oito bacias hidrográficas estudadas. Não podemos afirmar que o isolamento é total entre as várias bacias, pois apesar de no caso do Tejo e Guadiana termos obtido um resultado que mostra que 100% dos indivíduos destas bacias foram correctamente classificados, existem sempre alguns espécimes de outras bacias hidrográficas que apresentam características idênticas às observadas nestas duas bacias. Importa igualmente referir que as amostras provenientes do Lima e do Cávado mostram uma grande sobreposição, levando a supor que apesar das diferenças, é muito provável que façam parte de uma única população.

A falta de informação relativamente à fase trófica do ciclo de vida da lampreia-marinha passada no oceano, obriga-nos a colocar várias hipóteses que visam a explicação dos resultados obtidos:

**Hipótese 1:** As diferenças observadas reflectem diferenças ao nível genético e, por conseguinte, a troca de indivíduos entre as várias populações será muito reduzida. Este nível de isolamento reprodutor só seria compatível com a existência de um comportamento de *homing* bem marcado, o que a até à data ainda não foi confirmado para esta espécie. Na realidade, os estudos que abordaram esta questão, referem que efectivamente não existe *homing* nesta espécie (Bergstedt *et al.*, 1995; Waldman *et al.*, 2008). A verificar-se esta hipótese estar-se-ia também perante uma situação de controlo genético da composição em ácidos gordos dos lípidos totais do coração tal como alguns estudos, realizados com outras espécies, têm demonstrado (Grahl-Nielsen *et al.*, 1990; Grahl-Nielsen *et al.*, 1992; Grahl-Nielsen *et al.*, 1993; Mjaavatten *et al.*, 1998). Todavia,

seria de esperar que determinados ácidos gordos ou determinados *ratios* de ácidos gordos fossem bem demarcados nos diversos grupos obtidos, nomeadamente os  $\omega 3/\omega 6$  e C22:6 $\omega 3$ /C20:5 $\omega 3$  e ainda os ácidos C20:5 $\omega 3$  e C22:6 $\omega 3$ , devido à sua importância ao nível da composição e funcionalidade dos lípidos estruturais, o que não se detectou.

**Hipótese 2:** As diferenças observadas resultam da influência dos parâmetros ambientais durante a fase oceânica do ciclo de vida destes animais. Neste caso, estaríamos na presença de, pelo menos, oito zonas oceânicas, tantas quantas as bacias hidrográficas estudadas. De facto, existem numerosos factores ambientais que podem causar alterações na composição dos ácidos gordos estruturais dos tecidos, nomeadamente a temperatura, a salinidade e a pressão. Uma das possíveis causas poderia relacionar-se com a presença de hospedeiros que estariam a diferentes profundidades e consequentemente sujeitos a diferentes pressões e temperaturas. Perante este cenário, as lampreias poderiam efectivamente explorar a grande diversidade química de perfis em ácidos gordos dos lípidos totais do coração na composição das suas membranas de forma a defenderem as propriedades físicas das mesmas e darem uma resposta adaptativa ao meio onde se inseriam. Sabe-se que as espécies de peixes que habitam em meios cujas condições ambientais são relativamente estáveis e constantes podem desenvolver uma especialização das suas membranas de forma a desenvolverem uma adaptação completa ao meio onde vivem (Cossins and Prossen, 1978). Assim sendo, os grandes responsáveis pelas diferenças seriam os ácidos C20:5 $\omega 3$ ; C22:6 $\omega 3$ ; todos os ácidos gordos poliinsaturados de cadeia longa ( $\geq$  de 20 átomos de carbono) e provavelmente o C20:4 $\omega 6$  devido ao seu papel na estrutura e funcionalidade das membranas. Esta hipótese já parece ser melhor apoiada pelos resultados obtidos na medida em que a MDA revelou como discriminantes ácidos gordos como o C20:5 $\omega 3$  e o C20:4 $\omega 6$ . Contudo, torna-se difícil explicar o motivo pelo qual se registou uma segregação tão notória entre as várias amostras estudadas. Uma possível explicação poderá estar relacionada com a proximidade destas áreas oceânicas das várias bacias hidrográficas, o que significaria que na prática, ainda que não existisse um claro comportamento de *homing*, acabaria por existir segregação espacial e, eventualmente, isolamento reprodutor caso, este cenário, se repetisse em todas as épocas migratórias.

**Hipótese 3:** As diferenças observadas resultam da dieta praticada por estes animais durante a sua fase trófica no oceano. Isto significaria que os animais que foram capturados em cada uma das oito bacias hidrográficas parasitaram hospedeiros distintos e daí a variação para muitos dos ácidos gordos que foram considerados como discriminantes na MDA (C16:0; C18:1 $\omega 9$ ; C20:1 $\omega 9$ ; C18:3 $\omega 3$ ; C24:0; C24:1 $\omega 9$ ). Partindo do princípio que os vários grupos formados tiveram efectivamente uma dieta distinta em termos de ácidos gordos e que foram provenientes da mesma área e sujeitos à mesma pressão e temperatura, então as diferenças encontradas poderão ter sido induzidas pelo

factor dieta. Contudo, o possível impacto da dieta far-se-ia sentir ao nível dos triacilgliceróis e o tecido cardíaco é pobre em lípidos neutros e extremamente rico em lípidos polares. Por outro lado, os resultados obtidos ao nível do índice de condição alométrico, os valores de peso total e de lípidos totais do coração revelaram que o teor em gordura visceral (dado pelo índice de K alométrico) não se encontrava correlacionado com o teor em lípidos do músculo cardíaco para nenhuma das bacias estudadas e que o peso do coração também não se encontrava correlacionado com o seu teor lipídico, o que vem reforçar o facto de o coração ser constituído maioritariamente por lípidos polares e independente da influência da dieta. Assim sendo, é pouco plausível que esta hipótese seja a que melhor explica os resultados obtidos. Acresce que, à semelhança da hipótese 2, também neste caso as áreas de alimentação deveriam estar na proximidade das várias bacias hidrográficas, só assim se observaria o resultado obtido neste trabalho. E, tal como na hipótese anterior, caso a segregação espacial implique um isolamento reprodutor continuado, acabará por ocorrer diferenciação genética.

**Hipótese 4:** As diferenças observadas resultam do esforço despendido pelos animais durante a migração reprodutora, o que na prática significaria que os animais capturados em cada uma das bacias hidrográficas eram provenientes de locais distintos no oceano. Uma possível explicação poderia estar relacionada com o percurso migratório no oceano seguido por cada um destes grupos, o qual poderia direccionar os animais para a proximidade de uma determinada bacia hidrográfica. Seguindo a lógica utilizadas nas duas hipóteses anteriores, esta segregação geográfica poderá conduzir a diferenças genéticas. Contudo, há alguns aspectos que deveremos ter em consideração e que põem em causa esta hipótese. Na realidade, existem factores internos que causam alterações significativas nos perfis em ácidos gordos de vários tecidos e onde se destaca a actividade de migração e a actividade de natação (Joensen and Grahl-Nielsen, 2000). Mas, qualquer um destes factores tem o seu maior impacto ao nível dos lípidos neutros dos tecidos e não dos lípidos estruturais. Mais ainda, as diferenças em termos de ácidos gordos seriam a nível dos ácidos gordos saturados de cadeia média curta que são os principais ácidos a sofrer  $\beta$ -oxidação ao nível do tecido cardíaco para obtenção de energia, o que não é detectado na MDA (Tocher, 2003).

**Hipótese 5:** As diferenças observadas resultam do efeito dos factores ambientais durante a fase estuarina da migração reprodutora. A confirmar-se esta hipótese significaria que cada um dos ecossistemas estuarinos influenciaria de forma distinta os animais que neles entraram. Porém, sabendo-se da elevada variabilidade dos ecossistemas estuarinos (McLusky, 2004), é pouco provável que os animais capturados em cada uma das bacias hidrográficas tenham sido sujeitos às mesmas condições ambientais durante a sua passagem pelo estuário. Mais ainda, torna-se difícil explicar o motivo pelo qual não houve uma maior sobreposição das amostras analisadas visto todos os animais estarem na mesma fase do seu ciclo de vida e terem sido capturados à entrada dos estuários. Esta

questão suscita ainda mais dúvidas se tivermos em linha de conta que em três das bacias (*e.g.* Minho, Lima e Cávado) as amostragens foram efectuadas em duas datas distintas, com um intervalo superior a duas semanas (Minho: 3 e 15 de Abril; Lima: 21 de Março e 15 de Abril e Cávado: 11 de Março e 7 de Abril) e que revelaram, em cada bacia, perfil lipídico idêntico apesar das duas semanas de intervalo de tempo.

O esclarecimento destas dúvidas depende dos resultados dos estudos genéticos que neste momento estão a ser realizados (P.R. Almeida, *com. pess.*).





## 5. Conclusão

O presente estudo demonstrou que o perfil em ácidos gordos do músculo cardíaco de lampreias marinhas poderá ser utilizado como ferramenta para discriminar grupos populacionais com estratégias ecológicas idênticas.

Os índices peso do coração/ peso corporal obtidos nas lampreias marinhas das oito bacias hidrográficas aproximam-se dos animais poiquilotérmicos. O músculo cardíaco nos animais das bacias analisadas apresenta um conteúdo entre 23 a 46% em lípidos totais.

Os ácidos gordos predominantes foram os saturados, seguidos pelos monoinsaturados e poliinsaturados, apresentando maior poder discriminante os ácidos gordos C17:0, o C20:1 $\omega$ 9, o C16:0, o C20:4 $\omega$ 6, o C18:  $\omega$ 9 e o C14:0.

Este trabalho revelou uma segregação muito significativa entre as amostras provenientes das oito bacias hidrográficas estudadas mas não podemos afirmar que o isolamento é total entre as várias bacias, verificando-se que existem alguns espécimes de determinadas bacias hidrográficas que apresentam características que são partilhadas por indivíduos de outras bacias. O esclarecimento destes resultados deverá ser complementado por estudos genéticos.

Todavia, apesar dos resultados obtidos do perfil de ácidos gordos ser promissor, é necessária investigação futura para verificar a utilidade da análise do perfil em ácidos gordos do tecido cardíaco na discriminação de populações de lampreia-marinha.



## 6. Referências

- Ackman, R.G. (2002) - "The chromatograph in practical analysis of common and uncommon fatty acids for the 21<sup>st</sup> century", *Analytica Chimica*, 24: 1219-1227.
- Almaça, C. (1995) - "Freshwater fish and their conservation in Portugal", *Biological Conservation*, 72: 125-127.
- Almaça, C. and Collares-Pereira, M.J. (1988) - "On the occurrence of the European river lamprey, *Lampetra fluviatilis* L., in the Iberian Peninsula." *Cybium*, 12: 9-15.
- Almaça, C. and Cortes, R. (1991) - "On the occurrence of the European brook lamprey, *Lampetra planeri* (Bloch, 1784) (*Petromyzontidae*), in Portugal", *Cybium*, 15: 189-192.
- Almeida, P.R., Quintella, B.R. and Dias, N.M. (2002) - "Movement of radio-tagged anadromous sea lamprey during the spawning migration in the River Mondego (Portugal)", *Hydrobiologia*, 483: 1-8.
- Almeida, P.R., Quintella, B.R., Dias, N.M. and Andrade, N.O. (2002) - "The anadromous sea lamprey in Portugal: Biology and Conservation perspectives", American Fisheries Society, Vancouver, 49-58.
- Almeida, P.R., Silva, H.T. and Quintella, B.R. (2000) - "The migratory behaviour of the sea lamprey *Petromyzon marinus* L., observed by acoustic telemetry in River Mondego (Portugal)", Suffolk, CEFAS, Lowestoft, 99-108.
- Almeida, P.R., Silva, H.T. and Quintella, B.R. (2002) - "The spawning migration of the sea lamprey (*Petromyzon marinus* L.), in the River Mondego (Portugal)", *Aquatic ecology of the Mondego river basin. Global importance of local experience*, Pardal, M.A., Marques, J.C. and Graça, M.A., Coimbra, Imprensa da Universidade de Coimbra: 381-386.
- Andrade, N.O., Quintella, B.R., Ferreira, J., Pinela, S., Póvoa, I., Pedro, S. and Almeida, P.R. (2007) - "Sea lamprey (*Petromyzon marinus* L.) spawning migration in the Vouga river basin (Portugal): poaching impact, preferential resting sites and spawning grounds", *Hydrobiologia*, 582: 121-132.
- Applegate, V.C. (1950) - "Natural history of the sea lamprey, *Petromyzon marinus*, in Michigan", *Special Scientific Report* 55: 237.
- Araújo, F.G. and Vicentini, R.N. (2001) - "Relação peso-comprimento da corvina *Micropogonias furnieri* (Desmarest) (Pisces, Sciaenidae) na Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro", *Revista Brasileira de Zoologia*, 18: 133-138.
- Assis, C.A. (1990) - "Threats to the survival of anadromous fishes in the River Tagus, Portugal", *Journal of Fish Biology*, 37: 225-226.
- Baldaque da Silva, A.A. (1891) - "Estado actual das pescas de Portugal", Imprensa Nacional, Lisboa, 520.
- Bassingthwaighe, J.B., Noodleman, L., Van der Vusse, G.J. and Glatz, J.F.C. (1987) - "Modeling of palmitate transport in the heart", *Molecular Cell Biochemistry*, 88: 51-58.
- Beamish, F.W.H. (1980) - "Biology of the North American anadromous sea lamprey, *Petromyzon marinus*", *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37: 1924-1943.
- Beamish, F.W.H. and Potter, I.C. (1975) - "The biology of the anadromous sea lamprey (*Petromyzon marinus*) in New Brunswick", *Journal of Zoology*, 177: 57-72.

- Berg, J.M., Tymoczko, J.L. and Stryer, L. (2002) - "Fatty Acid Metabolism", Freeman, Nova York, 603-631.
- Bergstedt, R.A. and Seelye, J.G. (1995) - "Evidence for lack of homing by sea lampreys", *Transactions of the American Fisheries Society*, 124: 235-239.
- Bjerkeng, B., Storebakken, T. and Wathne, E. (1999) - "Cholesterol and short-chain fatty acids in diets for Atlantic salmon *Salmo salar* (L.): effects on growth, organ indices, macronutrient digestibility, and fatty acid composition", *Aquaculture Nutrition*, 5: 181-191.
- Bowman, W.C. and Rand, M.J. (1980) - "Textbook of pharmacology", Blackwell, Oxford,
- Caamano Tubío, R.I., Weber, R.A. and Aldegunde, M. (2010) - "Home tank anesthesia: a very efficient method of attenuating handling stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum)", *Journal of Applied Ichthyology*, 26: 116-117.
- Calder, P.C. (2001) - "N-3 polynsaturated fatty acids, inflammation and immunity: pouring oil on troubled water or another fishy tale?" *Nutrition Research*, 21: 309-341.
- Campos, L.S. (1998) - "Entender a Bioquímica. O metabolismo fundamental em animais e plantas", Escolar Editora, Lisboa, 683.
- Cossins, A.R. and MacDonald, A.G. (1989) - "The adaptation of biological membranes to temperature and pressure: Fish from the deep and cold", *Journal Membranes Biology*, 21: 115-135.
- Crockett, E.L. and Sidell, B.D. (1993) - "Substrate selectivities differ for hepatic mitochondrial and peroxisomal  $\beta$ -oxidation in an Antarctic fish, *Notothenia gibberifrons*", *Biochemical Journal*, 289: 427-433.
- Cunningham, J.G. (1999) - "Tratado de fisiologia veterinária", Editora Guanabara Koogans S.A, Filadélfia, 213-308.
- Czesny, S., Dabrowski, J.E., Christensen, J., Eenennaam, J.V. and Doroshov, S. (2000) - "Discrimination of wild and domestic origin of sturgeon ova based on lipids and fatty acid analysis", *Aquaculture*, 189: 145-153.
- De Windt, L.J., Cox, K., Hofstra, L. and Doevendans, P.A. (2001) - "Molecular and genetic aspects of cardiac fatty acid homeostasis in health and disease", *European Heart Journal*, 23: 774-787.
- Dempson, J.B. and Potter, T.R. (1993) - "Occurrence of sea lamprey, *Petromyzon marinus*, in Newfoundland river, with additional records from the northwest Atlantic", *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50: 1265-1269.
- Doadrio, I. (2001) - "Atlas y Libro Rojo de los Peces Continentales de España", Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Doadrio, I., Madrid, Museo Nacional de Ciencias Naturales,
- Duarte, A.C.L., Jorge, I., Sobral, M.P., Rebordão, F.R., Martins, R. and Carneiro, M. (2003). Rendimento do botirão usado na captura da lampreia *Petromyzon marinus* L. 1758 no estuário do Rio Mondego. Relatórios Científicos e Técnicos do IPIMAR. 8. Lisboa: 19.
- Economidis, P.S., Kallianiotis, A. and Psaltopoulou, H. (1999) - "Two records of sea lamprey from the north Aegean sea", *Journal of Fish Biology*, 55: 1114-1118.
- Farmer, J.G. (1980) - "Biology and physiology of feeding in adults lampreys", *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37: 1751-1761.
- Ferreira, M.T. and Godinho, F. (2002) - "Comunidades biológicas da albufeiras", *Ecossistemas Aquáticos e Ribeirinhos. Ecologia, Gestão e Conservação*, Moreira, I., Ferreira, M.T., Cortes, R., Pinto, P. and Almeida, P.R., Lisboa, Instituto da Água: 10.1-10.25.

- Fontagne, S., Burtairé, L., Corraze, G. and Bergot, P. (2000) - "Effects of dietary medium-chain triacylglycerols (tricaprylin and tricaproin) and phospholipid supply on survival, growth and lipid metabolism in common carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae", *Aquaculture*, 190: 289-303.
- Freyof, J. (2002) - "Freshwater fish diversity in Germany, threats and species extinction", *Freshwater fish conservation: options for the future*, Collares-Pereira, M.J., Coelho, M.M. and Cowx, I.G., Oxford, Fishing News Books: Blackwell Science: 3-22.
- Froyland, L., Madsen, L., Eckhoff, K.M., Lie, O. and Berge, R.K. (1998) - "Carnitine palmitoyltransferase I, carnitine palmitoyltransferase II, and acyl-CoA oxidase activities in Atlantic salmon (*Salmo salar*)", *Lipids*, 33: 923-930.
- Gibson, R.A. (1983) - "Australian fish-an excellent source of both arachidonic and 3 polyunsaturated fatty acids", *Lipids*, 18: 743-752.
- Glatz, J.F.C., Luiken, J.J., Van Nieuwenhoven, F.A. and Van der Vusse, G.J. (1997) - "Molecular mechanism of cellular uptake and intracellular translocation of fatty acids", *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 57: 3-9.
- Gobyurin, V.A. and Leont'eva, G.R. (1963) - "Chromaffin tissue and sources of catecholamines in the vertebrate heart", *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, Biryukov, D.A., Leningrad, USSR Academy of Sciences, 59: 98-100.
- Gosselin, R.E., Smith, R.P. and Hodge, H.C. (1984) - "Toxicologia clínica de produtos comerciais", Williams e Wilkins, Baltimore, 1984.
- Grahl-Nielsen, O. (1999) - "Comment: Fatty acids signatures and classification trees: new tool for investigating the foraging ecology of seals", *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56: 2219-2223.
- Grahl-Nielsen, O. and Mjaavatten, O. (1992) - "Discrimination of striped bass stocks: A new method based on chemometry of the fatty acid profile in heart tissue", *Transactions of the American Fisheries Society*, 121: 307-314.
- Grahl-Nielsen, O., Mjaavatten, O. and Tvedt, E. (1993) - "Distinguishing between different populations of harp seal (*Phoca groenlandia*) by chemometry of the fatty acid profiles in the jaw bone", *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 41: 856-864.
- Grahl-Nielsen, O. and Ulvund, K.A. (1990) - "Distinguishing populations of herring by chemometry of fatty acids", *American Fisheries Society Symposium*, 7: 566-571.
- Grant, W.S. (1987) - "Genetic divergence between congeneric Atlantic and Pacific Ocean fishes", *Population Genetics & Fishery Management*, Ryman, N. and Utter, F., Seattle, University of Washington Press: 225-246.
- Hair, J.F., Anderson, R.L., Tatham, R.L. and Black, W.C. (1998) - "Multivariate Data Analysis", Prentice Hall, Upper Saddle River, USA,
- Hajri, T. and Abumrad, N.A. (2002) - "Fatty acid transport across membranes: relevance to nutrition and metabolic pathology", *Annals Review Nutrition*, 33: 382-415.
- Halliday, R.G. (1991) - "Marine distribution of the sea lamprey (*Petromyzon marinus*) in the northwest Atlantic", *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48: 832-842.
- Halpern, M.J. (1997) - "Bioquímica", Lidel - Edições técnicas, Limitada, Lisboa,
- Hardisty, M.W. (1979) - "Biology of the Cyclostomes", Chapman & Hall, Londres, 428.
- Hardisty, M.W. (1986b) - "*Petromyzon marinus* Linnaeus, 1758", *The freshwater fishes of Europe. Petromyzontiformes*, Holčík, J., Wiesbaden, Aula-Verlag, 1: 94-116.

- Hardisty, M.W. and Potter, I.C. (1971a) - "The behaviour, ecology and growth of larval lampreys", *The Biology of Lampreys*, Hardisty, M.W. and Potter, I.C., London, Academic Press, 1: 85-125.
- Hardisty, M.W. and Potter, I.C. (1971b) - "The general biology of adult lampreys", *The biology of lampreys*, Hardisty, M.W. and Potter, I.C., London, Academic Press, 1: 127-206.
- Hardisty, M.W. and Potter, I.C. (1972) - "The Circulatory System", *The Biology of Lampreys*, Hardisty, M.W. and Potter, I.C., London, Academic Press, 2: 241-259.
- Harwood, J. (2007) - "Lipid Metabolism", CRC Press, Boca Raton, 637-702.
- Hasselbaink, D.M., Roemen, T.H.M. and Van der Vusse, G.J. (2002) - "Determination of long-chain fatty acids in heart and skeletal muscle by capillary gas chromatography", *Analytica Chimica*: 351-357.
- Henderson, J. and Tocher, D.R. (1987) - "The lipid composition and biochemistry of freshwater fish", *Progress in Lipid Research*, 26: 281-347.
- Henderson, R. (1996) - "Fatty acid metabolism in freshwater fish with particular reference to polyunsaturated fatty acids", *Archive of Animal Nutrition*, 49: 5-22.
- Henderson, R.J. and Almatar, S. (1989) - "Seasonal changes in the lipid composition of herring *Clupea harengus* in relation to gonad maturation", *The Marine Biological Association of the United Kingdom*, 69: 323-334.
- Henderson, R.J., Sargent, J.R. and Hopkins, C.C.E. (1984a) - "Changes in the content and fatty acid composition of lipid in an isolated population of the capelin, *Mallottus villosus*, during sexual maturation and spawning", *Marine Biology*, 78: 255-263.
- Henderson, R.J., Sargent, J.R. and Pirie, B.J.S. (1984b) - "Fatty acid catabolism in the capelin *Mallottus villosus* (Muller) during sexual maturation." *Marine Biology*, 5: 115-126.
- Holčík, J., Delic, A., Kucinic, M., Buhvic, V. and Vater, M. (2004) - "Distribution and morphology of the sea lamprey from the Balkan coast of the Adriatic Sea", *Journal of Fish Biology*, 64: 514-527.
- Hóraldur, J. and Grahl-Nielsen, O. (2004) - "Stock struture of *Sebastes mentella* in the North Atlantic revealed by chemometry of the fatty acid profile in heart tissue", *ICES Journal of Marine Science*, 61: 113-126.
- Hubbs, C.L. and Potter, I.C. (1971) - "Distribution, phylogeny and taxonomy", *The biology of lampreys*, Hardisty, M.W. and Potter, I.C., london, Academic Press, 1: 1-65.
- ICN (2006) - "Fauna,peixes", *Plano Sectorial da Rede Natura 2000*, Lisboa, Instituto da Conservação da Natureza: .
- INAG (1999a) - "Plano de Bacia Hidrográfica do Rio Douro", Lisboa, Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território, III
- INAG (1999b) - "Plano de Bacia Hidrográfica do Rio Guadiana", Lisboa, Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território, III
- INAG (1999c) - "Plano de Bacia Hidrográfica do Rio Minho", Lisboa, Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território, II
- INAG (1999d) - "Plano de Bacia Hidrográfica do Rio Mondego", Lisboa, Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território, I
- INAG (1999e) - "Plano de Bacia Hidrográfica do Rio Tejo", Lisboa, Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território, III
- INAG (1999f) - "Plano de Bacia Hidrográfica do Rio Vouga", Lisboa, Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território, III

- INAG (2000a) - "Plano de Bacia Hidrográfica do Rio Cávado", INAG, Lisboa, Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território, I
- INAG (2000b) - "Plano de Bacia Hidrográfica do Rio Lima", Lisboa, Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território, I
- Iverson, S.J., Field, C., DON BOWEN, W. and Blanchard, W. (2004) - "Quantitative fatty acid signature analysis: a new method of estimating predator diets", *Ecological Monographs*, 74: 211-235.
- Joensen, H. and Grahl-Nielsen, O. (2000) - "Discrimination of *Sebastes viviparus*, *Sebastes marinus*, and *Sebastes mentella* from Faroe Islands by chemometry of the fatty acid profile in the heart and gill tissues and in the skull oil", *Comparative Biochemistry and Physiology*, 126: 69-79.
- Joensen, H. and Grahl-Nielsen, O. (2004) - "Stock structure of *Sebastes mentella* in the North Atlantic revealed by chemometry of the fatty acid profile in heart tissue", *Journal of Marine Science*, 61: 113-126.
- Joensen, J., Steingrund, P., Fjallstein, I. and Grahl-Nielsen, O. (2000) - "Discrimination between two reared stocks of cod (*Gadus morhua*) from the Faroe Islands by chemometry of the fatty acid composition in the heart tissue", *Marine Biology*, 136: 573-580.
- Joensen, T., Daniélsdóttir, A.K., Meland, K. and Naevdal, G. (2000b) - "Studies of the genetic relationship between deep-sea and oceanic *Sebastes mentella* in the Irminger Sea", *Fisheries Research*, 49: 179-192.
- Joensen, T., Naevdal, G., Daniélsdóttir, A.K. and Hareide, N.R. (2000a) - "Genetic characterization of giant *Sebastes* in the deep water slopes in the Irminger Sea", *Fisheries Research*, 45: 207-216.
- Kang, J.X., Xiao, Y.F. and Leaf, A. (1995) - "Free, long-chain, polyunsaturated fatty acids reduce membrane electrical excitability in neonatal rat cardiac myocytes", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92: 3997 - 4001.
- Kapoor, B.G., Smit, H. and Verighina, I.A. (1975) - "The alimentary canal and digestion in teleosts", *Advances In Marine Biology*, 13: 109-239.
- Kirsch, P.E., Iverson, W.D., Bowen, W.D., Kerr, S.R. and Ackman, R.G. (1969) - "Fatty acid composition of the brain and body phospholipids of the anadromous salmon, *Oncorhynchus nerka*, from fresh-water and the marine habitat", *Comparative Biochemistry and Physiology*, 31: 419-430.
- Larsen, L.O. (1980) - "Physiology of adult lampreys, with special regard to natural starvation, reproduction, and death after spawning", *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37: 1762-1779.
- Le Blanc, P.J., Gills, T.E., Gerrits, M.F. and Ballantyne, J.S. (1995) - "Metabolic organization of liver and somatic muscle of landlocked sea lamprey *Petromyzon marinus* during spawning migration", *Canadian Journal of Zoology*, 73: 916-923.
- Le Cren, E.D. (1951) - "The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and conditions in the perch *Perca fluviatilis*", *Journal Animal Ecology*, 20: 201-201.
- Leaf, A. and Weber, P.C. (1988) - "Cardiovascular effects of n-3 fatty acids", *The New England Journal of Medicine*, 318: 549 - 557.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. and Cox, M.M. (1993) - "Principles of biochemistry", Worth, New York,
- Lelek, A. (1987) - "The Freshwater Fishes of Europe", *Threatened Fishes of Europe*, 9: 343.
- Li, W., Sorensen, P.W. and Gallaher, D.D. (1995) - "The olfactory system of migratory adult sea lamprey (*Petromyzon marinus*) is specifically and acutely sensitive to unique bile acids released by conspecific larvae", *Journal of General Physiology*, 105: 569-587.



- Lusk, S., Lusková, K., Halacka, S., Slechta, S. and Slechtová, V. (2002) - "Status and protection of species and intraspecific diversity of the ichthyofauna in the Czech Republic", *Freshwater fish conservation: options for the future*, Collares-Pereira, M.J., Coelho, M.M. and Cowx, I.G., Oxford, Fishing News Books, Blackwell Science: 23-33.
- Maitland, P.S. (1980) - "Review of the ecology of lampreys in northern Europe", *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37: 1944-1952.
- Maitland, P.S. (2003) - "Ecology of the River, Brook and Sea Lamprey. Conserving Natura 2000", English Nature, Peterborough, 55.
- McKenzie, D.J. (2001) - "Effects of dietary fatty acids on the respiratory and cardiovascular physiology of fish", *Comparative Biochemistry and Physiology*, 128: 607-621.
- McKenzie, D.J., Higgs, D.A., Dosanjh, B.S., Deacon, G. and Randall, D.J. (1998) - "Dietary fatty acid composition influences swimming performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in seawater", *Fish Physiology and Biochemistry* 19: 111-122.
- McKenzie, D.J., Piraccini, G., Agnisola, C., Steffensen, J.F., Bronzi, P., Bolis, C.L., Tota, B. and Taylor, E.W. (1999) - "The influence of dietary fatty acid composition on the respiratory and cardiovascular physiology of Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*): a review", *Journal of Applied Ichthyology*, 15: 265-269.
- McLusky, D. (2004) - "The estuarine ecosystem", Blackie, Glasgow, 215.
- Mjaavatten, O., Levings, C. and Poon, P. (1998) - "Variation in the fatty acid composition of juvenile chinook and coho salmon from Fraser river estuary determined by multivariate analysis; role of environment and genetic origin", *Comparative Biochemistry and Physiology*, 120: 291-309.
- Morkert, S.B., Swink, W.B. and Seelye, J.G. (1998) - "Evidence for early metamorphosis of sea lampreys in the Chippewa River, Michigan", *North American Journal of Fisheries Management*, 18: 966-971.
- Morman, R.H., Cuddy, D.W. and Rugen, P.C. (1980) - "Factors influencing the distribution of sea lamprey (*Petromyzon marinus*) in the Great Lakes", *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37: 1811-1826.
- Nawar, W.W. (1996) - "Lipids", Marcel Dekker, New York, 226-319.
- Nobre, A. (1932) - "Peixes das águas doces de Portugal", *Boletim do Ministério da Agricultura, Ano XIII, nº 2 - 1ª Série*: 44.
- Otis, T. and Heintz, R. (2003). Evaluation of two methods to discriminate Pacific herring (*Clupea pallasii*) stocks along the northern Gulf of Alaska, Alaska Department of Fish and Game National Marine Fisheries Service: 1-31.
- Pearce, W.A., Braem, R.A., Dustin, S.M. and Tibbles, J.J. (1980) - "Sea lamprey (*Petromyzon marinus*) in the Lower Great Lakes", *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37: 1802-1810.
- Penczak, T. (1964) - "Report on catching *Petromyzon marinus* L. in the River of Pilica", *Naturwissenschaften*: 51-322.
- Perez, J.A., Rodriguez, C. and Henderson, R.J. (1999) - "The uptake and esterification of radiolabelled fatty acids by enterocytes isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)", *Fish Physiology and Biochemistry* 20: 125-134.
- Pinela, S., Quintella, B.R., Almeida, P.R. and Lança, M.J. (2009) - "Comparison of the fatty acid profile of muscle neutral lipids and phospholipids of up-river anadromous sea lamprey (*Petromyzon marinus* L.) from three Portuguese river basins", *Scientia Marina*: 785-795.

- Potter, I.C. (1980) - "The Petromyzoniformes with particular reference to paired species", *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37: 1595-1615.
- Poupa, A. and Ostadal, B. (1969) - "Experimental cardiomegalies and "cardiomegalies" in free-living animals", *Annals of the New York Academy of Sciences*, 156: 445-468.
- Povz, M. (2002) - "Status of the freshwater fishes and lampreys in Slovenis", *Freshwater fish conservation: options for the future*, Collares-Pereira, M.J., Coelho, M.M. and Cowx, I.G., Oxford, Fishing News Books, Blackwell Science: 45-54.
- Quintella, B.R. (2006). Biologia e conservação da lampreia-marinha (*Petromyzon marinus* L.). Departamento de Biologia Animal. Lisboa, Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências. Doutoramento: 281.
- Quintella, B.R., Andrade, N.O. and Almeida, P.R. (2003) - "Distribution, larval stage duration and growth of the sea lamprey ammocoetes, *Petromyzon marinus* L., in a highly modified river basin", *Ecology of Freshwater Fish*, 12: 1-8.
- Rehbein, H. (1990) - "Electrophoretic techniques for species identification of fishery products", *Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 191: 1-10.
- Renaud, C.B. (1997) - "Conservation status of Northern Hemisphere lampreys (*Petromyzontidae*)", *Journal of Applied Ichthyology*, 13: 143-148.
- Rocha, M.A., Ribeiro, E.L.A., Mizubuti, I.Y., Borosky, J.C. and Antunes, M.I.P. (2008) - "Comparações entre famílias de meio irmãos paterno através do fator de condição de Fulton, alométrico e a taxa de crescimento em curimbatá (*Prochilodus lineatus*)", *Ciências Agrárias, Londrina*, 29: 947-954.
- Rogado, L., Alexandrino, P., Almeida, P.R., Alves, J., Bochechas, J., Cortes, R., Domingos, I., Felipe, F., Madeira, J. and Magalhães, F. (2005) - "Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal. Vol. II - Peixes Dulciaquícolas e Migradores", Serviço Nacional de Parques, Reservas e Conservação da Natureza, Lisboa, 55.
- Rossi-Wongtschowski (1977) - "Estudo das variações da relação peso total/comprimento total em função do ciclo reprodutivo e comportamento de *Sardinella brasiliensis* (Steindachner, 1879) da costa do Brasil entre 23º S e 28º S", *Boletim do Instituto Oceanográfico de São Paulo*, 26: 131-180.
- Royce, W.F. (1972) - "Introduction to the fishery science", Academic Press, New York,
- Ruf, T. and Arnold, W. (2008) - "Efeitos de ácidos graxos poliinsaturados em hibernação e torpor: uma revisão e uma hipótese", *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 294: 1044-1052.
- Saat, T., Jarvekulg, R., Eschbaum, R. and Tambets, J. (2002) - "The status of threatened freshwater fishes in Estonia", *Freshwater fish conservation: options for the future*, Collares-Pereira, M.J., Coelho, M.M. and Cowx, I.G., Oxford, Fishing News Books, Blackwell Science: 34-44.
- Saborido-Rey, F. and Nedreass, K.H. (2000) - "Geographic variation of *Sebastes mentella* in the Northeast Arctic derived from a morphometric approach", *ICES Journal of Marine Science*, 57: 965-975.
- Santos, J.M., Ferreira, M.T., Godinho, F.N. and Bochechas, J. (2002) - "Performance of fish lift recently built at the Touvedo Dam on the Lima River, Portugal", *Journal of Applied Ichthyology*, 18: 118-123.
- Sargent, J.R. (1989) - "Ether-linked glycerides in marine animals", CRC Press, Bacon Raton, Florida,

- Sargent, J.R. (1995) - "(n-3) Polyunsaturated fatty acids and farmed fish", *Fish Oil:Technology, Nutrition and Marketing*, Hamilton, R.J. and Rice, R.D., High Wycombe, England, Barnes & Associates: 67-94.
- Sawada, T., Takahashi, K. and Hatano, M. (1993) - "Triglyceride composition of tuna and bonito orbital oils", *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59: 285-290.
- Sheridan, M.A., Friedlander, J.K.L. and Allen, W.V. (1985) - "Chylomicra in the serum of post-prandial steelhead trout (*Salmo gairdneri*)", *Comparative Biochemistry and Physiology*, 81B: 281-284.
- Sidell, B.D., Crockett, E.L. and Driedzic, W.R. (1995) - "Antarctic fish preferentially catabolize monoenoic fatty acids", *Journal of Experimental Zoology*, 271: 73-81.
- Six, D.A. and Dennis, E.A. (2000) - "The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1488: 1-19.
- Smith, B.R. (1971) - "Sea lamprey in the Great Lakes of North America", *The biology of lampreys*, Hardisty, M.W. and Potter, I.C., London, Academic Press, 1: 207-247.
- Smith, B.R. and Tibbles, J.J. (1980) - "Sea lamprey (*Petromyzon marinus*) in Lakes Huron, Michigan and Superior: history of invasion and control, 1936-78", *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37: 1780-1801.
- Sundt, R.C. and Joensen, T. (1998) - "Low levels of interspecific DNA sequence variation of the mitochondrial 16S rRNA in North Atlantic redfish *Sebastes* (Pisces, Scorpaenidae)", *Sarsia*, 83: 449-452.
- Tocher, D.R. (2002) - "Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish", *Reviews in Fisheries Science*, 11: 107-184.
- Tocher, D.R. (2003) - "Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish", *Reviews in Fisheries Science*, 11: 107-184.
- Tocher, D.R., Fraser, A.J., Sargent, J.R. and Gamble, J.C. (1985a) - "Fatty acid composition of phospholipids and neutral lipids during embryonic and early larval development in Atlantic herring (*Clupea harengus* L.)", *Lipids*, 20: 69-74.
- Tocher, D.R., Fraser, A.J., Sargent, J.R. and Gamble, J.C. (1985b) - "Lipid class composition during embryonic and early larval development in Atlantic herring (*Clupea harengus* L.)", *Lipids*, 20: 84-89.
- Van Bilsen, M., Van der Vusse, G.J. and Reneman, R.S. (1998) - "Transcriptional regulation of metabolic processes: implications of cardiac metabolism", *Europe Journal Physiology*, 437: 2-14.
- Van der Vusse, G.J., Glatz, J.F.C., Stam, H.C.G. and Reneman, R.S. (1992) - "Fatty acid homeostasis in the normoxic and isquémic heart", *Physiological Reviews*, 72: 881-940.
- Van der Vusse, G.J., Glatz, J.F.C., Van Nieuwenhoven, F.A., Reneman, R.S. and Basingthwaighte, J.B. (1998) - "Transport of long-chain fatty acids across the muscukar endothelium", *Advances Experimental Med Biology*, 441: 181-191.
- Velisek, J. and Svobodová, Z. (2004) - "Anaesthesia of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) with 2-phenoxyethanol: Acute Toxicity and Biochemical Blood Profile", *Acta Veterinaria Brno*, 73: 379-384.
- Velisek, J., Svobodová, Z. and Piacková, V. (2005) - "Effects of Clove Oil Anaesthesia on Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)", *Acta Veterinaria Brno*, 74: 139-146.
- Voet, D. and Voet, J.D. (1995) - "Biochemistry", John Wiley & Sons, Inc., United States of America,

- Vusse, V.d. and al., e. (1992) - "Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart", *Physiological Reviews*, 72: 881-940.
- Waldman, J., Grunwald, C. and Wirgin, I. (2008) - "Sea lamprey *Petromyzon marinus*: an exception to the rule of homing in anadromous fishes", *Biology Letters*, 4: 659-662.
- Witkowski, A. (1992) - "Threats and protection of freshwater fishes in Poland", *Netherlands Journal of Zoology*, 42: 243-259.
- Young, R.J., Kelso, J.R.M. and Weise, J.G. (1990) - "Occurrence, relative abundance, and size of landlocked sea lamprey (*Petromyzon marinus*) ammocoetes in relation to stream characteristics in the Great Lakes", *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47: 1773-1778.
- Youson, J.H. (1980) - "Morphology and physiology of lamprey metamorphosis", *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37: 1687-1710.
- Youson, J.H. and Potter, I.C. (1979) - "A description of the stages of metamorphosis in the anadromous sea lamprey, *Petromyzon marinus* L." *Canadian Journal of Zoology*, 57: 1808-1817.
- Zakim, D. (2000) - "Thermodynamics of fatty acid transfer", *Journal Membr Biol*, 176: 101-109.
- Zhou, L. and Nilsson, A. (2001) - "Sources of eicosanoid precursor fatty pools in tissue", *Journal of Lipid Research*, 42: 1521-1542.

## Referências electrónicas:

Instituto da Água I.P. (INAG) (actualização em 2010, criado pelo Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território, acedido 15/08/2010)

Disponível em <http://www.inag.pt/>

Instituto da Conservação da Natureza e Biodiversidade (ICNB) (actualização em 2010, criado pelo Instituto da Conservação da Natureza em 2005, acedido a 15/08/2010)

Disponível em <http://portal.icnb.pt>

Diário da Republica Electrónico (DRE) (actualização em 2010, criado por Imprensa Nacional – Casa da Moeda, acedido em 29/08/2010)

Disponível em <http://www.dre.pt>

*Expert Analysis System* (actualização em 2010, criado por *Swiss Institute of Bioinformatics*, acedido em 05/10/2010)

Disponível em <http://www.expasy.org/spot>

Visão Bioquímica (actualização em 2010, criado por Wagner Fontes, acedido a 08/10/2010)

Disponível em <http://www.bioq.unb.br>

Geo\_apoio (actualização em 2010, criado em 2008, por desconhecido)

Disponível em <http://geoapoio.files.wordpress.com/2009/04/rios.jpg>

## Anexos

Resultados da análise de modelo geral linear (GLM) para os ácidos que apresentaram significativamente diferentes entre as oito bacias hidrográficas.

### C10:0

Código bacias	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Mondego	Douro	Cávado	Lima
Tejo	x			+	+	+	+	+
Vouga		x		+	+	+	+	+
Minho			x	+	+	+	+	+
Guadiana	+	+	+	x				
Mondego	+	+	+		x			
Douro	+	+	+			x		
Cávado	+	+	+				x	
Lima	+	+	+				-	x

### C12:0

Código bacias	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Mondego	Douro	Cávado	Lima
Tejo	x							
Vouga		x						
Minho			x	+				
Guadiana			+	x				
Mondego					x			
Douro						x		
Cávado							x	
Lima								x

### C13:0

Código bacias	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Mondego	Douro	Cávado	Lima
Tejo	x			+		+	+	+
Vouga		x		+		+	+	+
Minho			x	+		+	+	+
Guadiana	+	+	+	x	+			
Mondego				+	x			+
Douro	+	+	+			x		
Cávado	+	+	+				x	
Lima	+	+	+		+			x

**C14:0**

Código bacias	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Mondego	Douro	Cávado	Lima
Tejo	X			+		+		
Vouga		x		+		+		
Minho			x	+	+	+	+	
Guadiana	+	+	+	x	+		+	+
Mondego			+	+	x	+		
Douro	+	+	+		+	x		+
Cávado			+	+			x	
Lima			+	+		+		x

**C15:0**

Código bacias	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Mondego	Douro	Cávado	Lima
Tejo	X						+	
Vouga		x					+	
Minho			x				+	
Guadiana				x				
Mondego					x			
Douro						x		
Cávado	+	+	+				x	
Lima								x

**C16:0**

Código bacias	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Mondego	Douro	Cávado	Lima
Tejo	X			+	+	+	+	+
Vouga		x		+	+	+	+	+
Minho			x	+	+	+	+	+
Guadiana	+	+	+	x	+		+	+
Mondego	+	+	+	+	x			
Douro	+	+	+			x		
Cávado	+	+	+	+			x	
Lima	+	+	+	+				x

**C16:1**

Código bacias	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Mondego	Douro	Cávado	Lima
Tejo	X			+		+		
Vouga		x		+		+		
Minho			x	+		+		
Guadiana	+	+	+	x	+		+	+
Mondego				+	x	+		
Douro	+	+	+		+	x	+	+
Cávado				+		+	x	
Lima				+		+		x

**C17:0**

Código bacias	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Mondego	Douro	Cávado	Lima
Tejo	x			+	+			
Vouga		x		+	+			
Minho			x	+	+			
Guadiana	+	+	+	x		+	+	+
Mondego	+	+	+		x	+	+	+
Douro				+	+	x		
Cávado				+	+		x	
Lima				+	+			x

**C18:0**

Código bacias	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Mondego	Douro	Cávado	Lima
Tejo	x			+	+	+	+	+
Vouga		x		+	+	+	+	+
Minho			x	+	+	+	+	+
Guadiana	+	+	+	x				+
Mondego	+	+	+		x			
Douro	+	+	+			x		
Cávado	+	+	+				x	
Lima	+	+	+	+				x

**C18:1w9**

Código bacias	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Mondego	Douro	Cávado	Lima
Tejo	x	+		+	+	+	+	+
Vouga	+	x		+	+			+
Minho			x	+	+	+	+	+
Guadiana	+	+	+	x				
Mondego	+	+	+		x	+	+	+
Douro	+		+		+	x		+
Cávado	+		+		+		x	+
Lima	+	+	+		+	+	+	x

**C18:3w6**

Código bacias	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Mondego	Douro	Cávado	Lima
Tejo	x			+	+	+		+
Vouga		x		+	+	+		
Minho			x	+	+	+	+	+
Guadiana	+	+	+	x			+	+
Mondego	+	+	+		x		+	+
Douro	+	+	+			x		
Cávado			+	+	+		x	
Lima	+		+	+				x



**C18:3ω3**

Código bacias	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Mondego	Douro	Cávado	Lima
Tejo	x		+					
Vouga		x	+					
Minho	+	+	x	+	+	+	+	+
Guadiana			+	x				
Mondego			+		x			
Douro			+			x		
Cávado			+				x	
Lima			+					x

**C20:0**

Código bacias	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Mondego	Douro	Cávado	Lima
Tejo	x							
Vouga		x						
Minho			x					
Guadiana				x				
Mondego					x			
Douro						x		
Cávado							x	
Lima								x

**C20:1ω9**

Código bacias	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Mondego	Douro	Cávado	Lima
Tejo	x	+		+	+	+	+	
Vouga	+	x		+	+	+	+	+
Minho			x	+	+	+	+	+
Guadiana	+	+	+	x				
Mondego	+	+	+		x			
Douro	+	+	+			x		
Cávado	+	+	+				x	
Lima	+	+	+					x

**C20:2**

Código bacias	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Mondego	Douro	Cávado	Lima
Tejo	x			+	+	+	+	+
Vouga		x		+	+	+	+	+
Minho			x	+	+	+	+	+
Guadiana	+	+	+	x				
Mondego	+	+	+		x			
Douro	+	+	+			x		
Cávado	+	+	+				x	
Lima	+	+	+					x

**C20:3ω6**

Código bacias	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Mondego	Douro	Cávado	Lima
Tejo	X			+	+	+		
Vouga		x		+	+	+		
Minho			x	+		+		
Guadiana	+	+	+	X				
Mondego	+	+			x			
Douro	+	+	+			x		
Cávado							x	
Lima								x

**C20:3ω3**

Código bacias	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Mondego	Douro	Cávado	Lima
Tejo	X							
Vouga		x						
Minho			x	+		+		
Guadiana			+	x				
Mondego					x			
Douro			+			x		
Cávado							x	
Lima								x

**C20:4ω6**

Código bacias	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Mondego	Douro	Cávado	Lima
Tejo	X	+	+	+	+	+	+	+
Vouga	+	x						
Minho	+		x					
Guadiana	+			x				
Mondego	+				x			
Douro	+					x		
Cávado	+						x	
Lima	+							x

**C20:5ω3**

Código bacias	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Mondego	Douro	Cávado	Lima
Tejo	X							
Vouga		x		+		+		
Minho			x	+		+		+
Guadiana		+		x			+	
Mondego					x			
Douro		+	+			x		
Cávado				+			x	
Lima			+					x

**C22:0**

Código bacias	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Mondego	Douro	Cávado	Lima
Tejo	x							
Vouga		x						
Minho			x					
Guadiana				x				
Mondego					x			
Douro						x		
Cávado							x	
Lima								x

**C22:1w9**

Código bacias	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Mondego	Douro	Cávado	Lima
Tejo	x			+				
Vouga		x						
Minho			x					
Guadiana	+			x			+	+
Mondego					x			
Douro						x		+
Cávado				+			x	
Lima				+		+		x

**C22:0**

Código bacias	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Mondego	Douro	Cávado	Lima
Tejo	x							
Vouga		x						
Minho			x	+		+		
Guadiana			+	x			+	+
Mondego					x			
Douro			+			x	+	+
Cávado				+		+	x	+
Lima				+		+		x

**C22:5w3**

Código bacias	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Mondego	Douro	Cávado	Lima
Tejo	x				+	+		
Vouga		x			+			
Minho			x					
Guadiana				x	+			
Mondego	+	+		+	x			+
Douro	+					x		
Cávado							x	
Lima					+			x

**C22:6ω3**

Código bacias	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Mondego	Douro	Cávado	Lima
Tejo	x							
Vouga		x		+				
Minho			x	+				
Guadiana		+	+	x				
Mondego					x			
Douro						x		
Cávado							x	
Lima								x

**C23:0**

Código bacias	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Mondego	Douro	Cávado	Lima
Tejo	x			+		+	+	
Vouga		x		+		+	+	
Minho			x	+		+	+	
Guadiana	+	+	+	x	+			
Mondego				+	x		+	
Douro	+	+	+			x		
Cávado	+	+	+		+		x	
Lima								x

**C24:0**

Código bacias	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Mondego	Douro	Cávado	Lima
Tejo	x						+	+
Vouga		x					+	+
Minho			x				+	
Guadiana				x			+	+
Mondego					x		+	
Douro						x	+	+
Cávado	+	+	+	+	+	+	x	
Lima	+	+		+		+		x

**C24:1ω9**

Código bacias	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Mondego	Douro	Cávado	Lima
Tejo	x						+	+
Vouga		x					+	+
Minho			x				+	+
Guadiana				x				+
Mondego					x			
Douro						x	+	+
Cávado	+	+	+			+	x	
Lima	+	+	+	+		+		x

ω6

Código bacias	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Mondego	Douro	Cávado	Lima
Tejo	X					+		
Vouga		x	+				+	
Minho		+	X	+	+	+		+
Guadiana			+	X			+	
Mondego			+		X		+	
Douro	+		+			X	+	
Cávado		+		+	+	+	X	
Lima				+				X

ω3

Código bacias	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Mondego	Douro	Cávado	Lima
Tejo	X			+		+	+	+
Vouga		x						
Minho			X	+				
Guadiana	+		+	X	+			
Mondego				+	X	+	+	
Douro	+				+	X		
Cávado	+				+		X	
Lima	+							X

ω3/ω6

Código bacias	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Mondego	Douro	Cávado	Lima
Tejo	x	+		+	+	+		
Vouga	+	x	+				+	
Minho		+	X	+	+	+		
Guadiana	+		+	X				
Mondego	+		+		X			
Douro	+		+			X	+	
Cávado		+				+	X	
Lima								X

Impares

Código bacias	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Mondego	Douro	Cávado	Lima
Tejo	x			+	+	+	+	+
Vouga		x		+	+	+	+	+
Minho			X	+	+	+	+	+
Guadiana	+	+	+	X		+		
Mondego	+	+	+		X			
Douro	+	+	+			X		
Cávado	+	+	+				X	
Lima	+	+	+					X

**C20<Cy<C22**

Código bacías	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Mondego	Douro	Cávado	Lima
Tejo	x						+	
Vouga		x						
Minho			x					
Guadiana				x				
Mondego					x		+	
Douro						x		
Cávado	+				+		x	
Lima								x

**y = número de carbonos****C20:4ω6/C20:5ω3**

Código bacías	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Mondego	Douro	Cávado	Lima
Tejo	x							
Vouga		x						
Minho			x	+		+		+
Guadiana			+	x	+			
Mondego				+	x	+		+
Douro			+		+	x		
Cávado							x	
Lima			+		+			x

**C22:6ω3/C20:5ω3**

Código bacías	Tejo	Vouga	Minho	Guadiana	Mondego	Douro	Cávado	Lima
Tejo	x				+			
Vouga		x			+			
Minho			x		+			
Guadiana				x	+			
Mondego	+	+	+	+	x	+	+	+
Douro					+	x		
Cávado					+		x	
Lima					+			x